

**Untersuchungen zur Beteiligung
von Ethylen und Gibberellinen
an pflanzlichen Entwicklungsprozessen**

Daniela Kriechbaum



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554622_0006

Untersuchungen zur Beteiligung von Ethylen
und Gibberellinen an pflanzlichen
Entwicklungsprozessen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Diplom-Biologin Daniela Kriechbaum
aus Eggenfelden

April 1986

1. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rau
2. Berichterstatter: Prof.Dr.W.Rüdiger

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Mai 1986

Inhaltsverzeichnis

	Seite:
1. Einleitung	1
2. Pflanzenmaterial und Anzucht	13
2.1. <i>Gossypium hirsutum</i>	13
2.2. <i>Hyoscyamus niger</i>	14
3. Einfluß cellulolytischer Enzyme auf die Ethylenproduktion in Baumwollpflanzen	16
3.1. Material und Methoden	16
3.1.1. Infiltration verschiedener Gewebetypen der Baumwollpflanze mit Cellulase-Präparaten	16
3.1.2. Gaschromatographische Bestimmung der pflanzlichen Ethylensynthese	18
3.2. Ergebnisse	18
3.2.1. Ethylenproduktion in verschiedenen Gewebetypen der Baumwollpflanze	18
4. Die Rolle der Gibberelline bei der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung	29
4.1. Material und Methoden	29
4.1.1. Belichtungsbedingungen	29
4.1.2. Extraktion, Reinigung und Auftrennung der Gibberelline von <i>Hyoscyamus niger</i> in Vorstufen, freie Säuren und an Zucker gebundene Konjugate	30
4.1.3. Chromatographische Verfahren zur Auftrennung der einzelnen Gibberellinfraktionen aus pflanzlichem Material	34
4.1.4. Der Microdrop-Bioassay als Nachweismethode für freie Gibberellinsäuren und Gibberellin-vorstufen	38

4.1.4.1.	Anzucht von <i>Oryza sativa</i>	39
4.1.5.	Aufstellung einer Eichkurve für den Micro- drop-Bioassay und Diskussion seiner Signi- fikanz	40
4.2.	Ergebnisse	45
4.2.1.	Photoperiodische Reaktion von <i>Hyoscyamus</i> <i>niger</i> auf Dauerweißlicht	45
4.2.2.	Qualitative und quantitative Veränderungen im Gibberellinmuster während der Blühinduk- tion	46
4.2.2.1.	Freie Gibberellinsäuren	46
4.2.2.2.	Gibberellinvorstufen	50
5.	Einfluß von UV-B-Strahlung auf den Gibbe- rellinhaushalt während der Blühinduktion bei <i>Hyoscyamus niger</i>	53
5.1.	Belichtungsbedingungen	53
5.2.	Ergebnisse	56
5.2.1.	Einfluß von UV-B-Strahlung verschiedener Intensitäten auf die Blühinduktion	56
5.2.2.	Einfluß von UV-B auf den Gibberellinhaus- halt	58
5.2.2.1.	Freie Gibberellinsäuren	58
5.2.2.2.	Gibberellinvorstufen	62
6.	Diskussion	65
7.	Zusammenfassung	75
8.	Literaturverzeichnis	79

Verwendete Abkürzungen

DDG	=	2-Deoxy-D-Glucose
GA	=	Freie Gibberellinsäuren
GC	=	Gaschromatographie
H.n.	=	Hyoscyamus niger L.
HPLC	=	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
KT	=	Kurztag
KTP	=	Kurztagpflanze
KLTP	=	Kurzlangtagpflanze
LTP	=	Langtagpflanze
LKTP	=	Langkurztagpflanze
PVP	=	Polyvinylpyrrolidon
RP	=	Reverse Phase Chromatographie

1. Einleitung

Das Problem der interzellulären Koordination und der Abstimmung zwischen den einzelnen Teilen des Organismus wurde in der Natur unterschiedlich gelöst. Bei höheren Tieren erfolgt die Weitergabe eines Signals über das Nervensystem oder Hormone. Höheren Pflanzen steht kein Nervensystem zur Verfügung, so daß hier die Steuerung von Zellen, Geweben und Organen nur auf chemischer Basis erfolgen kann, durch pflanzeneigene Hormone, sogenannte Phytohormone. Dies sind Stoffklassen, die in sehr geringen Konzentrationen wirksam sind, jedoch weitaus weniger spezifisch agieren, als tierische Hormone.

In der Entwicklung höherer Pflanzen spielen 5 Hormongruppen eine wesentliche Rolle: Auxine, Gibberelline, Cytokinine, Abscisinsäure und Ethylen. Bekannte und gut untersuchte Beispiele für hormongesteuerte Entwicklungsvorgänge sind:

- a) die Förderung der Zellstreckung und des Wachstums der Seitensprosse und -wurzeln durch Auxine
- b) die Steuerung der Keimung und des Sproßachsenwachstums durch Gibberelline
- c) die Anregung der Zellteilung und die Verzögerung der Seneszenz durch Cytokinine

- d) die Steuerung der stomatären Transpiration und der Fruchtabscission durch Abscisinsäure
- e) die Steuerung der Alterungs- und Abtrennungsprozesse von Früchten und Blättern durch Ethylen.

Produktions- und Wirkort sind bei Phytohormonen bisweilen identisch. Da dies der klassischen Definition eines Hormons widerspricht, wird heute bei Pflanzen meist der Begriff "Wachstumsregulatoren" verwendet, der zudem die gesamte Palette an synthetischen Verbindungen einschließt, die, an Pflanzen verabreicht, wie pflanzeigene Hormone wirken.

Durch die Vielzahl von Wirkungsmechanismen kommt es im Wirkungsbereich der Phytohormone zu Überschneidungen und damit zu synergistischen bzw. antagonistischen Reaktionen. Inwieweit diese Wechselwirkungen die natürliche Entwicklung der Pflanze steuern, ist noch weitgehend ungeklärt. Nur bei wenigen Wachstums- und Entwicklungsvorgängen dürfte ein einzelnes Hormon eine alleinige oder überwiegende Rolle spielen.

Neben den experimentell mehrfach belegten Steuerfunktionen der Hormone ist bei einer Reihe anderer hormonell gesteuerter Entwicklungsvorgänge der Mechanismus noch ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb an zwei solcher ungeklärter Fälle zur Aufklärung der Rolle der Hormone beigetragen werden.

- Am Beispiel der durch Schadinsekten ausgelösten Ethylenproduktion in Baumwollpflanzen sollte Induktion und Wirkung dieses Hormons untersucht werden.
- In den Untersuchungen zur Blühinduktion wurden wiederholt Phytohormone, im Besonderen die Gruppe der Gibberelline, als maßgebliche steuernde Faktoren in Betracht gezogen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle der Gibberelline bei der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung an der Langtagpflanze *Hyoscyamus niger* erarbeitet werden.

In einer anschließenden Versuchsreihe sollte am Parameter "Gibberellinhaushalt" die Wirkung von UV-Strahlen auf die Blühinduktion untersucht werden.

Induktion der Ethylenbiosynthese in Baumwoll- pflanzen

Ethylen ist als gasförmiger Wachstumsregulator an verschiedenen physiologischen Prozessen beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit war besonders seine steuernde Funktion bei Alterungs- und Abtrennungsprozessen von Interesse. Ethylen verändert in alterndem Gewebe und in reifenden Früchten die Transporteigenschaften der Membranen, aktiviert den Zellverband auflösende Enzyme und katalysiert diese Effekte durch Stimulierung seiner eigenen Synthese.

Die im Zusammenhang mit Reife und Seneszenz beobachteten Ethyleneffekte werden an Baumwollpflanzen durch Pflanzenschädlinge hervorgerufen. Das Schadinsekt *Pseudatomoscelis seriatus* Reuter (Fam. Miridae) brütet auf sich entfaltenden Kotyledonen, Blütenknospen und Früchten der Baumwolle. Dabei löst es im befallenen Gewebe eine Überproduktion an Ethylen aus. Die erhöhte Hormonsynthese hat die Abscission von Blättern, Blüten und Früchten und Wachstumshemmung zur Folge. Powell (1974) konnte zeigen, daß bereits ein Insekt pro Pflanze die Wuchshöhe signifikant reduziert.

Aus der Landwirtschaft sind noch weitere Pflanzenschädlinge bekannt, die, wie *Pseudatomoscelis* auf Nutzpflanzen brüten und dort beträchtliche Schäden anrichten können. Adulte Tiere der Art *Anthonomus grandis* fressen die Samenkapseln

von Baumwoll- und Okrapflanzen (King und Lane, 1969; Tingey und Pillemer, 1977). *Lygus lineolaris* brütet auf Baumwolle, Luzernen und einigen Gemüsesorten und löst frühzeitigen Fruchtabfall aus (Henny und Cleveland, 1976) und *Lygus disponsi* ist auf Zuckerrübenblätter spezialisiert, wo er Seneszenz der Blätter und letztlich ihre Abscission verursacht (Hori, 1975).

Trotz der Vielzahl an Beobachtungen ist der Mechanismus über den diese Insekten das pflanzliche Gewebe zu einer "Stressreaktion" veranlassen, im konkreten Falle zu einer Hormonüberproduktion, noch weitgehend ungelöst.

In Anbetracht der großen Schäden, die besonders *Pseudatomoscelis* in den Baumwollanbaugebieten der USA verursacht, wurde von USDA (United States Department of Agriculture) ein Projekt gestartet, in dem Entomologen, Physiologen und Pflanzenpathologen gemeinsam diese Fragestellung bearbeiten. Um gezielt gegen die Schädlinge vorgehen zu können, sollte neben dem Brutverhalten der Insekten auch das ethylensynthesisierende Enzymsystem der Pflanzen untersucht werden. Für die Aufklärung des Mechanismus, über den *Pseudatomoscelis* so entscheidend in die pflanzliche Entwicklung eingreift, wurden folgende Ansätze in Betracht gezogen:

- Zum einen könnte die vermehrte Ethylenproduktion die Folge einer Verletzung des meristematischen Gewebes durch das brütende Insekt sein.
- Als Auslöser wären auch biologische Substanzen wie Aminosäuren (Methionin), Enzyme oder Hormone (Auxine) denkbar, die das Insekt möglicherweise mit der Speichelflüssigkeit in die Pflanze injiziert.
- Zu klären ist auch, welche Rolle die Mikroorganismen, drei Pilzarten und ein Bakterium, spielen, die nur auf den von Insekten befallenen Pflanzen gefunden wurden (Duffey und Powell, 1979).

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Beantwortung eines Teilaspektes dieses Projektes. Anderson et al. (1982) hatten gezeigt, daß Tabakblätter, unabhängig von einem Schädlingsbefall, auf zellwandabbauende Enzyme höchst empfindlich reagieren, die Ethylenbiosynthese wird drastisch gesteigert. Sollte die Speichelflüssigkeit von *Pseudatomoscelis* ähnlich wirkende Komponenten enthalten ? Parallel zu den Versuchen, die Bestandteile der Speichelflüssigkeit von *Pseudatomoscelis* zu identifizieren, sollte die Wirkung von cellulolytischen Enzymen auf das ethylenbildende System in verschiedenen Gewebetypen der Baumwollpflanze getestet werden. In Versuchsreihen mit verschiedenen Cellulasepräparaten wurde untersucht, in welchem Entwicklungsstadium Kotyledonen, Blütenknospen und Früchte am sensitivsten reagieren.

Die Rolle der Gibberelline bei der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung

Bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts wurde von Klebs (1903; 1911) und Tournois (1914) die Hypothese aufgestellt, daß der bedeutendste entwicklungsphysiologische Prozeß in der Pflanze, die Blühinduktion, durch die Tageslänge reguliert wird. Garner und Allard führten 1923 Versuche mit Sojabohnen-Varietäten und Tabak durch (Garner und Allard, 1920; 1923), die bestätigten, daß der Zeitpunkt der Aussaat einen entscheidenden Einfluß auf den Blühzeitpunkt hat. Sie schlossen daraus, daß die Pflanze eine interne Messung der relativen Tageslänge vornimmt und das Meßergebnis in eine steuernde Funktion umsetzt. Die Reaktion der Pflanze auf eine bestimmte Tageslänge wurde als Photoperiodismus bezeichnet und Hillman (1969) definiert diesen Vorgang als "response to the timing of light and darkness".

Gemäß ihrem photoperiodischen Verhalten lassen sich die Pflanzen in drei Hauptgruppen einteilen: Kurztagpflanzen, Langtagpflanzen und Tagneutrale. Bei den beiden zuerst

genannten Gruppen wird noch zwischen qualitativer und quantitativer Reaktion auf die Lichtperiode unterschieden: Qualitative Lang- bzw. Kurztagpflanzen blühen nur unter- bzw. oberhalb einer bestimmten "kritischen" Tageslänge. Kombinationstypen wie LKTP und KLTP sind ebenfalls bekannt. Tagneutrale Pflanzen werden durch die Tageslänge nicht in ihrem Blühverhalten beeinflusst. Unabhängig davon, welchem photoperiodischen Typus eine Pflanze angehört, kann eine einmal erfolgte Blühinduktion auch durch nachfolgende nicht-induktive Behandlung nicht mehr revertiert werden.

Der Zeitmeßmechanismus der Pflanzen ist noch weitgehend ungeklärt. Es werden zwei Modelle diskutiert:

- Der sogenannte "Sanduhrmechanismus" nimmt an, daß biochemische Reaktionen, die bestimmte, nicht näher charakterisierte Endprodukte anhäufen, zu Beginn der Dunkelperiode starten. Eine gewisse zu erreichende Schwellenkonzentration dieser Stoffe hätte nach diesem Modell schließlich die Blühinduktion zur Folge (Vince, 1972).
- Die zweite Hypothese sieht die Erklärung nicht in der Konzentrationserhöhung bestimmter Stoffe, sondern in einer circadianen Rhythmik bezüglich des Lichtes. Darunter ist eine Art "innerer Uhr" mit meist 24-stündigem Rhythmus zu verstehen. Die Zeitmessung der Pflanzen wäre an diese endogene Tagesrhythmik gebunden (Bünning, 1963).
Trotz zahlreicher Untersuchungen zu dieser Fragestellung kann bis heute keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Bereits 1934 konnte Knott mit seinen Experimenten an *Spinacia oleracea* demonstrieren, daß die Pflanze die Tageslänge mit den Blättern mißt. Diese bedeutende Funktion der Blätter konnte Zeevaart (1958) an *Perilla* bestätigen. Er pfropfte Blätter induzierter Pflanzen auf nicht-induzierte Pflanzen und erzielte damit einen Blüherfolg. Aus diesen Ergebnissen leitet sich ab, daß Blühinduktion und Blütenbildung zwei klar

voneinander getrennte Vorgänge sind. Aufgrund dieser Trennung von Ort der Reizperzeption und Ort der Reizrealisierung forderte Chailakhyan bereits 1936, daß am Apex nur dann Blüten ausgebildet werden können, wenn ein Stimulus existiert, der von den Blättern zum Apex transportiert wird; er nannte diesen Stimulus "Florigen".

Daß ein sozusagen wanderungsfähiges Signal vorhanden sein muß, zeigen eindeutig folgende experimentellen Ergebnisse:

- Chailakhyan selbst demonstrierte (1936) an der KTP *Chrysanthemum*, daß es genügt, nur wenige Blätter einer Pflanze der induktiven Photoperiode auszusetzen, um in der Pflanze Blütenbildung zu induzieren.
- In weiteren Experimenten wurde die Wanderung des Blühstimulus nachgewiesen. Von induzierten Pflanzen der Arten *Pharbitis nil* (KTP) und *Lolium temulentum* (LTP) wurden in Intervallen nach der Induktion Blätter abgeschnitten und dadurch die Wanderung des Stimulus pro Zeiteinheit beschrieben (Zeevaart, 1962).
- In Pfropfversuchen konnte gezeigt werden, daß der Blühstimulus von einer induzierten Pflanze auf eine nicht-induzierte der gleichen Art, einer anderen Art und sogar eines photoperiodisch verschieden reagierenden Typs übertragen werden kann (Lang, 1965; Evans, 1969; Zeevaart, 1976).

Die Existenz eines Blühstimulus scheint also weitgehend gesichert. Dennoch ist die Florigen-Hypothese bis heute nur ein durch eine Vielzahl experimenteller Befunde gestütztes "physiologisches Konzept" (Zeevaart, 1978).

Ungewiß ist, ob die Blütenbildung durch einen Promotor, das Florigen, oder einen Inhibitor, das Antiflorigen, wie es Lang nannte, geregelt wird (Denffer, 1950; Wellensiek, 1959; Lang, 1979). Unabhängig davon, welche Hypothese von den auf diesem Gebiet arbeitenden Gruppen favorisiert wird, konzentriert

sich die Forschung auf die Suche nach der entsprechenden Substanz bzw. Substanzklasse, welche als Stimulus in Frage kommt. Deshalb wurden die verschiedensten chemischen Verbindungen, darunter auch Pflanzenwuchsstoffe, auf ihren induzierenden Einfluß hin untersucht (Zeevaart, 1978). Ein Grund dafür, daß das Florigen aber noch immer nicht identifiziert werden konnte, könnte darin liegen, daß es eine Kombination verschiedener Verbindungen ist. Zeevaart (1976) zieht ein Zusammenspiel verschiedener Phytohormone, die in ihrer Konzentration photoperiodisch reguliert werden, in Erwägung. In der Vergangenheit wurde bereits des öfteren eine Beteiligung der Phytohormone an der Blühinduktion diskutiert. Zum einen ist das Wirkungsspektrum der Phytohormone sehr breit gefächert und es ist von anderen Entwicklungsprozessen bekannt, daß sie durch ein fein abgestimmtes Konzentrationsverhältnis der Phytohormone reguliert werden. Zum anderen entspricht der Vorgang der Blühinduktion in seinem Charakter einer klassischen hormongesteuerten Reaktion.

Unter den auf eine induzierende Wirkung hin getesteten Substanzen fanden die Gibberelline besondere Beachtung. Neben einem blühfördernden Effekt konnten für diese Hormongruppe auch induzierende Eigenschaften nachgewiesen werden. Nachdem Gibberelline in allen höheren Pflanzen vorkommen, ist zu vermuten, daß es sich bei diesen Ergebnissen nicht nur um pharmakologische Effekte handelt. Gibberelline können in vielen Langtag-Rosettenpflanzen, in LKTP und einigen vernalisationsbedürftigen Pflanzen, Blütenbildung induzieren (Zeevaart, 1983). In KTP konnte mit einigen Ausnahmen (Pharis, 1972; Williams und Morgan, 1979) dieser Effekt nicht beobachtet werden. Nicht alle Langtag-Rosettenpflanzen können unter nicht-induktiven Bedingungen mit Gibberellinen induziert werden; in einigen dieser Arten wirken Gibberelline nur in ihrer eigentlichen Funktion als Wachstumshormone und induzieren Sproßstreckung und keine Blütenbildung (Peterson und Yeung, 1972; Van de Pol, 1972). Aus diesen Beobachtungen folgt, daß die Gibberelline nicht mit dem Blühstimulus identisch sein

können. Gibberelline beeinflussen nach Lang in erster Linie die Sproßstreckung und die Blütenbildung wird nur sekundär beeinflusst (Lang, 1956b; 1957). Warm (1980) konnte jedoch an der LTP *Hyoscyamus niger* die von Lang aufgestellte Theorie zum Teil widerlegen. Er applizierte GA_3 in verschiedenen Konzentrationen auf seine Versuchspflanzen und beobachtete, daß der Schwellenwert für die Blühinduktion ($0.4 \mu g GA_3$ /Pflanze) wesentlich unter dem Grenzwert für die Induktion der Sproßstreckung ($2-8 \mu g GA_3$ /Pflanze) liegt. Diese beiden voneinander getrennten Vorgänge, Sproßstreckung und Blühinduktion, sind in den meisten Arbeiten mit Gibberellinen beobachtet worden. Gibberelline sind in erster Linie Sproßstreckungshormone. Ungeklärt ist bisher zum einen der blühinduzierende Effekt der Gibberelline und zum anderen, warum dieser Effekt nur bei einigen Langtagpflanzen und bei vernalisationsbedürftigen Pflanzen zur Ausprägung kommt. Zwei Erklärungen werden hierfür diskutiert:

- Andere Faktoren, außer den Gibberellinen, sind für die Produktion des Florigen limitierend (Zeevaart, 1983).
- In den bisher durchgeführten Versuchen wurde meist GA_1 , GA_3 , GA_4 oder GA_7 appliziert, weil nur diese käuflich oder leicht in entsprechenden Mengen zu gewinnen waren. Daß dabei keine oder nur eine unvollständige Blühinduktion erzielt wurde, könnte darin begründet sein, daß das "falsche" Gibberellin appliziert worden war (Zeevaart, 1983). Bei der Vielzahl von inzwischen strukturell charakterisierten Gibberellinen, 72 verschiedene (Phinney, 1985), wäre es durchaus denkbar, daß jede Pflanzenart im Laufe der Evolution ihr typisches Gibberellinmuster entwickelt hat. Ein möglicher Weg, die Bedeutung der Gibberelline am Induktionsvorgang zu klären, ist der von Zeevaart (1983) in seinem Übersichtsartikel zu den Gibberellinen vorgeschlagene: Vorangiges Ziel wäre es, den Gehalt an endogenen Gibberellinen in einer

Pflanzenart sowohl quantitativ als auch qualitativ zu bestimmen und dann eventuelle Veränderungen im Gibberellinspiegel während der Blühinduktion zu untersuchen.

Schädigung der photoperiodischen Induktion bei
Hyoscyamus niger durch UV-Bestrahlung

Bereits in den vierziger Jahren wurden Effekte des kurzwelligen Sonnenlichtes auf biologische Systeme untersucht (Knapp et al., 1939; Hollaender und Emmons, 1941). Heute haben solche Untersuchungen noch durch den Aspekt der zunehmenden Umweltbelastungen durch anthropogene Aktivitäten an Bedeutung gewonnen. Seit einigen Jahren wird vermutet, daß die atmosphärische Ozonschicht durch Zerfallsreaktionen des Ozons reduziert wird. Die Ozonschicht in der Stratosphäre fungiert als Schutzschicht gegenüber der extrem kurzwelligen Solarstrahlung. Nach Lockhart und Brodführer-Franzgrote (1961) wird der ultraviolette Anteil des Sonnenlichtes in drei Kategorien unterteilt:

UV-A	400-320 nm
UV-B	320-280 nm
UV-C	280-200 nm

Die Erdoberfläche wird bisher nur von UV-Strahlung des Typs A und B erreicht; auch bei einer 90 % Reduktion der Ozonschicht würde das extrem gefährliche UV-C die Erdoberfläche nicht erreichen.

Über den Wellenlängenbereich des UV-A sind bisher nur wenige Effekte auf biologische Systeme beobachtet worden (Caldwell, 1968; 1971). Große Aufmerksamkeit muß jedoch dem mittleren Wellenlängenbereich des UV-Lichtes von 320-280 nm gewidmet werden, weil die Intensität der Strahlung dieser Wellenlängen bei einer Reduktion der Dicke der Ozonschicht zunehmen würde.

Für die Destruktion der Ozonschicht werden vor allem Fluorchlorkohlenwasserstoffe verantwortlich gemacht, die als Treibgase in Spraydosen und als Schäumungs- und Kältemittel Verwendung finden. Der Mechanismus, der zur Destruktion der Ozonschicht führt, ist weitgehend geklärt. Ozon wird in der Stratosphäre einerseits durch kurzwelliges Licht (<200 nm) gebildet, andererseits in einer langsameren Reaktion mit Sauerstoff in zwei Moleküle Sauerstoff zerlegt (Chapman, 1930). An die Stelle des atomaren Sauerstoffs können Chlorradikale treten, die photochemisch aus den erwähnten Gasen gebildet wurden. Durch diese photoaktivierten Radikalreaktionen kann das Ozongefüge erheblich verändert und für kurzwellige Strahlung durchlässiger werden.

Da wichtige biologische Substanzen wie z.B. Nukleinsäuren, Proteine und Phytohormone UV-B-Strahlung stark absorbieren, wurde mit einer schädigenden Wirkung auf die Entwicklung von Pflanzen gerechnet und deshalb entsprechende Untersuchungen durchgeführt, von denen hier einige Beispiele angeführt werden sollen. Im Nutzpflanzenanbau ist das Phänomen des Auspflanzungsschocks bekannt. Das Glas der Gewächshäuser ist UV-B-undurchlässig und Jungpflanzen sind den im Freiland auftretenden UV-B-Strahlen oft nicht gewachsen und verkümmern. Eine UV-Adaptationsphase konnte diesen Schock in seiner Auswirkung mindern (Bogenrieder und Klein, 1977). Die Schwächung der Jungpflanzen ist mit die Folge einer Herabsetzung der Photosyntheserate (Steinmüller, 1979; Tevini et al., 1981). An Keimlingen von *Rumex patientia* wurde eine Reduktion der Blattgröße unter UV-B-Einwirkung beobachtet (Sisson und Caldwell, 1976) und Dickson und Caldwell (1978) konnten eine Herabsetzung der Zellteilungsrate nachweisen. An einigen Nutzpflanzen wurde sogar eine Verminderung der Gesamtbiomasse bis zu 50 % festgestellt (Biggs und Kossuth, 1978).

Über eine Wirkung von UV-B auf die photoperiodische Induktion der Blütenbildung und auf den Gibberellinhaushalt der Pflanze ist nichts bekannt. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, den Einfluß von zusätzlicher UV-B-Strahlung auf Gibberellinmuster und -gehalt der Blätter im Zusammenhang mit der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung zu klären.

2. Pflanzenmaterial und Anzucht

2.1. Gossypium hirsutum

Baumwollsaamen der gelbblühenden Kultursorte Stoneville 825 wurden in einer Pflanzmischung aus Torf, Sand und Vermiculit (1:1:1) in Töpfe mit 15 cm Durchmesser in 5 cm Tiefe ausgesät. Die Anzucht erfolgte im Gewächshaus bei einer mittleren Tagestemperatur von 32°C und 22-25°C Nachttemperatur. Die relative Luftfeuchtigkeit schwankte zwischen 85 und 90 %. Nach ca. 21 Tagen wurden die Keimlinge zu je drei Pflanzen in größere Tontöpfe (Ø 20 cm, Tiefe 25 cm) mit gleicher Pflanzmischung pikiert. Während der Anzuchtphase wurden die Pflanzen zweimal, später dreimal pro Woche, gedüngt. 45-50 Tage nach der Aussaat hatten die Pflanzen eine Größe von ca. 1.30 m erreicht und entwickelten erste Blütenknospen, die sich nach einer Entwicklungsperiode von 3-4 Wochen öffneten. Bestäubung (Selbstbestäubung oder durch Insekten) erfolgte innerhalb weniger Stunden nach dem Öffnen der Blüte, jedoch stets am ersten Tag. Nach weiteren 24 Stunden nahmen die gelben Blütenblätter einen rosa Farbton an und fielen innerhalb einer Woche ab, während bereits die Frucht heranreifte. Nach 24 Tagen erreichen die Früchte der Baumwollpflanze ihre volle Größe, aber weitere 24-40 Tage sind dazu nötig, daß die Fasern voll ausreifen. Die Streckung und Verdickung der Baumwollfasern erhöht das Gewicht der reifenden Frucht. Ungefähr 120 Tage nach der Aussaat öffneten sich die ersten Früchte.

2.2. Hyoscyamus niger

In allen Versuchen wurde mit der einjährigen gelbblühenden Rasse von *Hyoscyamus niger* L. (H.n., Bilsenkraut, Solanaceae) gearbeitet. Das Samenmaterial wurde erstmals 1937 von Melchers gewonnen und wird seitdem durch ständige Selbstbestäubung der Pflanzen erhalten.

Bei *Hyoscyamus niger* handelt es sich um eine qualitative Langtagpflanze, die, hält man sie unter ihrer kritischen Tageslänge von ca. 11 Stunden, in der vegetativen Phase verbleibt. Die Kurztagbedingungen wurden bei der Anzucht im Gewächshaus durch Abdecken der Pflanzen mit Dunkelstürzen garantiert.

Die Samen von H .n. keimten in Vermiculit. Nach etwa 14 Tagen wurden die Keimlinge in Tonschalen pikiert und nach weiteren vier Wochen einzeln in Tontöpfe von acht cm Durchmesser getopft. Bis zur Verwendung für einen Versuch und bis zur anschließenden Auswertung standen die Pflanzen im Gewächshaus bei einer mittleren Tagestemperatur von 22-24°C und 15-20°C bei Nacht. Die Lichtperiode wurde auf 8-10 Stunden begrenzt. In der lichtarmen Jahreszeit wurde das natürliche Licht durch Glühlampen (Typ Philips "Comptalux", 300 Watt) ergänzt und eine Beleuchtungsstärke von ca. 5000 Lux eingestellt.

Gelegentlich auftretende Pflanzenschädlinge wurden mit Insektiziden (Metasystox, Rospin) bekämpft. Zwei Wochen vor den Versuchen, sowie während der Nachreaktionszeit kamen keine chemischen Substanzen zur Anwendung.

Sollten die Versuchspflanzen auf Blütenbildung untersucht werden, so wurden sie 6-7 Wochen nach dem jeweiligen Versuchsbeginn unter dem Präpariermikroskop auf das Vorhandensein von Blütenanlagen kontrolliert.

Als Blüherfolg wurde gewertet, wenn der Vegetationspunkt Blütenprimordien ausdifferenziert hatte. Außerdem wurde die Anzahl der nach Versuchsbeginn entwickelten Blätter (Blattzuwachs) bestimmt. Dies ist nach Lang und Melchers (1943) ein Maß für die photoperiodische Induktionsstärke.

3. Einfluß cellulolytischer Enzyme auf die Ethylenproduktion in Baumwollpflanzen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Infiltration verschiedener Gewebetypen der Baumwollpflanze mit Cellulase-Präparaten

Nachdem Kotyledonen, Blütenknospen und Früchte unterschiedlichen Alters bzw. Entwicklungsstandes vornehmlich dem Befall durch Schadinsekten ausgesetzt sind, wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen auf diese Gewebetypen gelegt. Kotyledonen wurden ab einem Alter von 3 Tagen getestet. Blütenknospen wurden, da ihr Alter nicht exakt zu bestimmen war, nach ihrem Gewicht klassifiziert, das zunehmende Reife bzw. Alter widerspiegelt. Das Alter der Baumwollfrüchte wurde bestimmt, indem man die Blütenknospen am Tag des Aufblühens markierte.

Aus Kotyledonen und Früchten wurden mittels eines Korkbohrers ($\emptyset$ 4.5 mm) Blatt- und Fruchtwandscheiben ausgestanzt und jeweils fünf nach Bestimmung ihres Gesamtgewichtes als eine Probe eingesetzt. Blütenknospen wurden unzerteilt infiltriert.

Für den Infiltrationsvorgang wurden folgende Testlösungen verwendet:

Zwei Cellulase-Präparate, deren wesentlicher Unterschied in ihrer spezifischen Aktivität liegt, wurden in diesen Versuchsreihen in ihrer Wirkung auf die oben genannten Gewebetypen untersucht.

a) Cellulysin Cellulase :

spez. Aktivität 10.000 U/g

b) Worthington Cellulase

spez. Aktivität 25.000 - 45.000 U/g

Die Infiltration selbst erfolgte in 25 ml Erlenmeyerkolben. Die Gewebeproben wurden mit einer Lösung von 300 U/3 ml (Kotyledonen, Früchte) oder 300 U/10 ml (Blütenknospen) des zu testenden Enzympräparates übergossen. Jeder Ansatz wurde mit Chloramphenicol versetzt, um die Gewebeproben während des Versuchsablaufs weitgehend frei von Microorganismenbefall zu halten.

Jeder Kolben wurde an der Wasserstrahlpumpe 15 Minuten evakuiert und anschließend langsam belüftet. Dabei füllten sich die Interzellullarräume des Gewebes mit der Testlösung. Die überschüssige Lösung wurde abgegossen und die Kolben nach ca. 20 Minuten mit Septa verschlossen.

An diese Versuchsreihen schlossen sich Experimente an, in denen die Gewebeproben neben dem jeweiligen Cellulasepräparat auch mit 2-Deoxy-D-Glucose (DDG; 10^{-5} M) behandelt wurden. DDG ist ein Hemmstoff der Glucansynthetase und mit Hilfe dieser Versuche sollte gezeigt werden, ob es sich bei der wirksamen Enzymkomponente möglicherweise um dieses Enzym handelt, das in den Cellulase-Präparaten als Verunreinigung enthalten ist.

3.1.2. Gaschromatographische Bestimmung der pflanzlichen Ethylensynthese

Erstmals sechs Stunden nach Verschuß des Kolbens und weiterhin in konstanten Abständen bis zu insgesamt 35 Stunden nach Versuchsbeginn wurde die gebildete Ethylenmenge gaschromatographisch bestimmt. Für die Messungen wurde der GC 72-5 der Fa. Beckman verwendet; angeschlossen war ein Linear Recorder zur Aufzeichnung der Daten. Als Trägergas wurde Helium verwendet (70 cc/min), die Flußrate betrug 32.5 cc/min, die Temperatur des Flammenionisationsdetektors 143°C; die Säulentemperatur betrug 100°C.

Vor den Probenmessungen wurde der Gaschromatograph mit bekannten Ethylenmessungen (10, 100, 500 ppm) geeicht. Die Retentionszeit für Ethylen betrug in diesem System 1 Min. 15 Sek. Für die einzelnen Probenmessungen wurde jeweils 1 ml injiziert.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Ethylenproduktion in verschiedenen Gewebetypen der Baumwollpflanze

Wie unter 3.1.1. beschrieben, wurden die Gewebeproben mit jeweils 300 U Cellulysin infiltriert. Diese Enzymaktivität ergab die am besten meßbaren Ergebnisse. Geringere Aktivitäten lieferten zum Teil stark schwankende Ergebnisse oder die gebildeten Mengen von Ethylen waren so gering, daß sich die Peaks in den Diagrammen kaum vom Grundrauschen der Geräte abhoben. Wesentlich höhere Enzymaktivitäten hatten bereits nach kurzer Zeit eine weitgehende Zersetzung des untersuchten Gewebes zur Folge.

Um eine Fehlinterpretation der Ergebnisse zu vermeiden, wurden mit jedem Versuchsansatz wasserinfiltrierte Proben als Kontrollen mitgeführt. Die Art der Gewinnung der

Gewebeproben ließ eine von enzymatischen Einflüssen unabhängige Ethylenproduktion erwarten. Nachdem es sich bei dem verwendeten Cellulase-Präparat um kein hochgereinigtes Enzym, sondern mehr um eine Kombination cellulytisch wirkender Enzyme handelt, wurde 2-Deoxy-D-Glucose, der Hemmstoff der Glucansynthetase, in Parallelversuchen getestet.

Zur Auswertung der Diagramme aus den gaschromatographischen Messungen wurde die Peakhöhe auf die Ethylenstandards bezogen und Frischgewicht der Proben und Kolbenvolumen in μl Ethylen/g Frischgewicht umgerechnet.

Alle Werte in den Tabellen 1-3 sind Durchschnittswerte aus 3-4 Einzelversuchen. Die angegebenen Ethylenmengen sind die Maximalmengen, die vom Gewebe innerhalb einer 35-stündigen Inkubationszeit nach 21-26 Stunden gebildet wurden. Die Kolben waren jeweils nach einer Messung kurz belüftet und dann wieder verschlossen worden. Messungen in kurzen Abständen nach Inkubationsbeginn zeigten, daß die Ethylenproduktion nach ca. 6 Stunden einsetzte.

a) Blütenknospen

Die Blütenknospen wurden nach ihrem Gewicht geordnet und unzerteilt in den Versuchen eingesetzt. Wasserinfiltrierte Kontrollen bildeten, unabhängig von ihrem Gewicht, im Durchschnitt 0.7×10^{-2} μl Ethylen; die Werte in Tab. 1 und Abb. 1 sind um diesen Wert korrigiert. Auf eine Angabe der Ethylenmengen in $\mu\text{l/g}$ Frischgewicht wurde in diesem Fall verzichtet, weil sich die Werte, wie bereits erläutert, auf ein bestimmtes Gewicht beziehen, das den Entwicklungsstand charakterisiert.

Tab.1:

Ethylenproduktion von Blütenknospen in verschiedenen Entwicklungsstadien (repräsentiert durch das Gewicht) nach Infiltration von a) Cellulysin und b) Cellulysin + DDG.

Gewicht (g)	a)	b)
	$\mu\text{l Ethylen} \times 10^{-2}$	$\mu\text{l Ethylen} \times 10^{-2}$
0.229	0.3	
0.272	0.2	--
0.326	0.6	
0.363	1.0	1.8
0.429	16.2	
0.472	33.8	2.3
0.511	40.7	
0.527		6.2
0.572	57.3	
0.627		8.8
0.658	65.7	
0.708		14.6
0.867	69.9	16.1
0.899		18.6
0.934		22.1
0.946	75.7	23.3
1.010	79.9	

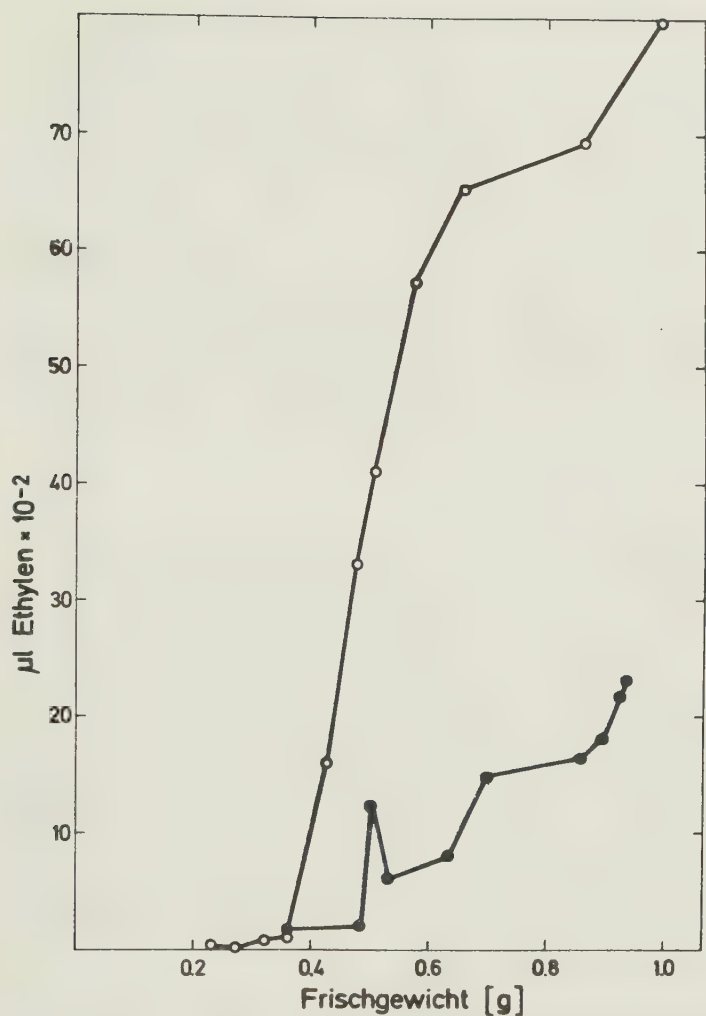


Abb.1:
Ethylenproduktion in Blütenknospen in Relation zu
steigendem Gewicht bzw. Reifegrad.
○—○ nach Behandlung mit Cellulysin
●—● nach Behandlung mit Cellulysin + DDG

Die Ergebnisse zeigen, daß sehr junge Knospen auf eine Zufuhr von cellulolytischen Enzymen kaum reagieren; erst ab einem bestimmten - allerdings relativ frühen - Entwicklungszustand wird durch die Infiltration Ethylenproduktion induziert, deren Stärke zunächst drastisch und dann gegen Ende der Entwicklung etwas weniger ansteigt.

Infiltrationsversuche mit Cellulysin + DDG zeigten, daß die Aktivität der hormonstimulierenden Komponenten im Enzympräparat durch den Hemmstoff reduziert wird (Vergleich a) zu b), in Tab.1). Generell zeichnete sich auch in diesen Versuchen die mit dem Reifegrad zunehmende Sensitivität des Gewebes gegenüber cellulolytischen Enzymen ab.

b) Früchte

Die Ethylenproduktion in den Kontrollen dieser Versuchsserie erreichte altersunabhängig einen Durchschnittswert von 3.7×10^{-2} μ l Ethylen/g Frischgewicht. Die Angaben in Tab. 2 und Abb. 2 sind bereits um diesen Wert korrigiert. Baumwollfrüchte wurden erstmals in einem Alter von 11 Tagen untersucht. In diesem frühen Reifestadium ist die Ethylenproduktion nach Behandlung mit Cellulysin vergleichsweise niedrig, betrachtet man die Werte im Alter von 25 Tagen. 3 1/2 Wochen nach der Bestäubung ist der Reifeprozess der Samenkapsel abgeschlossen; nicht beendet ist jedoch die Reifung der Baumwollfasern. Mit diesem Entwicklungsschritt ist eine hohe Sensitivität gegenüber cellulolytischen Enzymen gekoppelt, die in der Folge wieder abnimmt.

Die Ergebnisse in Tabelle 2b zeigen, daß auch in diesem Gewebetypus die die Ethylensynthese anregenden Enzyme durch DDG entscheidend gehemmt werden.

Tab.2:

Ethylensyntheseleistung von Baumwollfrüchten in Abhängigkeit von ihrem Alter nach Behandlung mit a) Cellulysin und b) Cellulysin + DDG.

Alter (d)	a)	b)
	$\mu\text{l Ethylen} \times 10^{-2}/\text{g}$ Frischgewicht	$\mu\text{l Ethylen} \times 10^{-2}/\text{g}$ Frischgewicht
11	7.4	
12		--
14	5.3	
16	1.3	
17		0.2
19	20.6	5.2
25	26.5	
27		3.8
28	16.1	
29		2.6
30	9.0	
33	8.7	
35		1.5
39	7.3	
41	2.5	
44	0.8	
45	0.6	

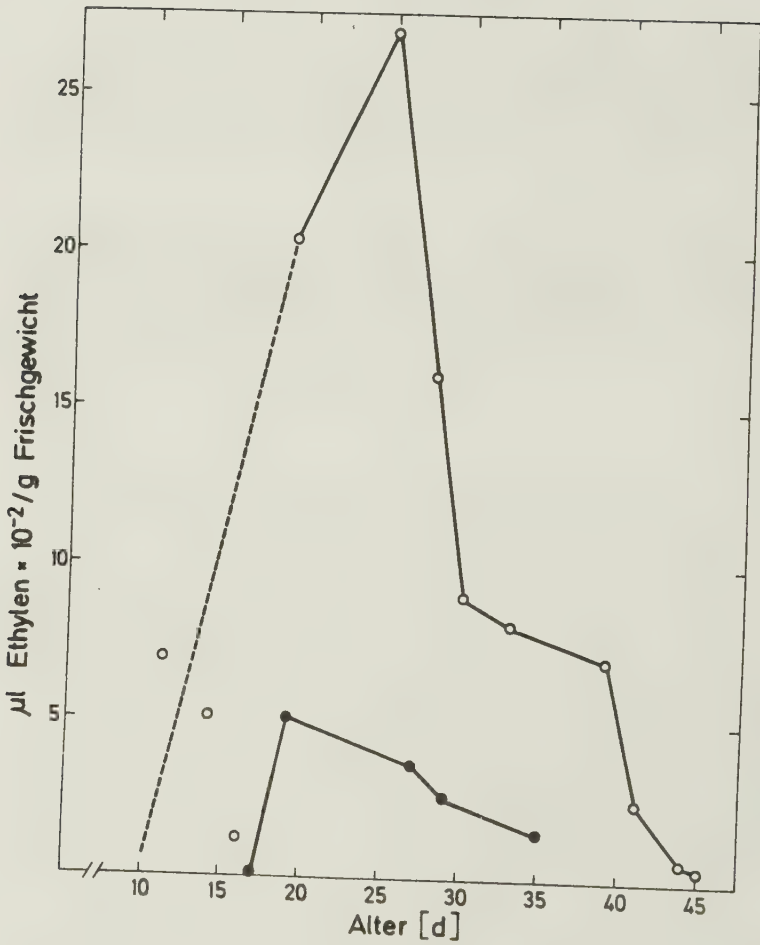


Abb.2:
Vergleich der Ethylenproduktion in Baumwollfrüchten
nach Behandlung mit Cellulysin (o—o) oder mit
Cellulysin + DDG (●—●).

c) Kotyledonen

Gelegentlich wurde auch in sehr jungen Baumwollkulturen ein Befall mit *Pseudatomoscelis seriatus* beobachtet. Aus diesem Grunde wurden auch Kotyledonen in die Tests mit einbezogen.

In wasserinfiltrierten Kontrollen wurden im Durchschnitt 8.7×10^{-2} μ l Ethylen/g Frischgewicht gebildet. Die Werte in Tab. 3, Abb. 3, sind um diesen Betrag korrigiert.

Kotyledonen reagieren besonders im Alter von 3-8 Tagen mit einer Steigerung der Ethylensynthese. Nachdem der Pflanze in diesem frühen Entwicklungsstadium keine anderen zur Photosynthese befähigten Organe zur Verfügung stehen, bedeutet eine frühe Infektion der Kotyledonen das Verkümmern und letztlich das Absterben der Pflanze. In der späteren Entwicklung reduziert sich mit der Bedeutung der Kotyledonen auch die Sensitivität dieses Gewebes gegenüber cellulolytischen Enzymen.

Versuche mit DDG haben auch in diesem Falle, die hemmende Wirkung dieser Substanz bestätigt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß verschiedene Gewebetypen der Baumwollpflanze abhängig von ihrem Entwicklungszustand bzw. Reifegrad unterschiedlich stark auf cellulolytische Enzyme reagieren. Generell konnte jedoch eine enorme Stimulierung des ethylensynthetisierenden Apparates beobachtet werden.

Zur weiteren Klärung des von *Pseudatomoscelis* in Baumwollpflanzen induzierten Vorganges, wurden diese Versuche mit dem höher gereinigten Cellulase-Präparat von Worthington Diagnostics wiederholt. Verglichen mit den Ergebnissen aus den Behandlungen mit Cellulysin, zeigten sich nahezu keine Veränderungen. Die Ethylensynthese wurde mit Cellulase von

Tab.3:

Ethylenproduktion in Kotyledonen unterschiedlichen Alters nach Behandlung mit a) Cellulysin und b) Cellulysin + DDG.

Alter (d)	a)	b)
	μl Ethylen $\times 10^{-2}/\text{g}$ Frischgewicht	μl Ethylen $\times 10^{-2}/\text{g}$ Frischgewicht
3	125.0	
5	127.4	
6	121.0	
8		12.2
12		9.0
14	32.5	
17		4.6
19	20.6	
20		6.7
22	11.3	
25		2.5
26	9.6	
27	15.1	
28	13.3	
29		0.7
33	9.9	
34	7.3	

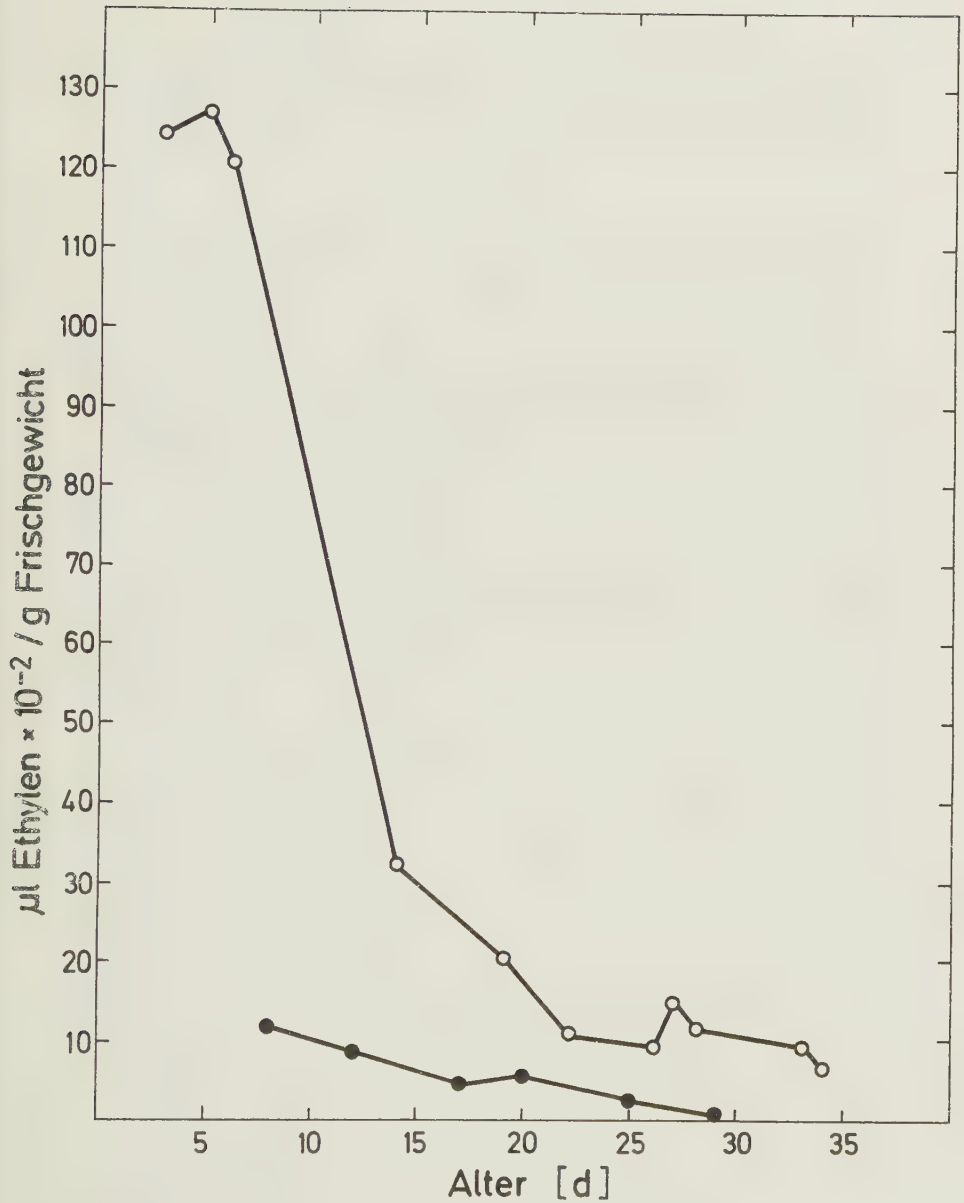


Abb.3:
Ethylenproduktion in Kotyledonen unterschiedlichen Alters
nach Behandlung mit Cellulysin (o—) oder mit Cellulysin
+ DDG (●—).

Worthington gleichermaßen gesteigert. In Versuchen, in denen gleichzeitig der Hemmstoff DDG verabreicht wurde, konnte keine Herabsetzung der Ethylenproduktion beobachtet werden.

Aus diesen Ergebnissen muß gefolgert werden, daß die Steigerung der Ethylenproduktion nicht allein auf einer Verunreinigung des Cellulase-Präparates mit dem Enzym Glucansynthetase beruht; der Reinheitsgrad des verwendeten Cellulase-Präparates spiegelte sich nicht in unterschiedlicher Steigerung der Hormonsynthese wider. In diesem Zusammenhang muß auch die Frage gestellt werden, wie spezifisch DDG hemmt ? Werden nicht auch andere cellulolytische Enzyme in ihrer Aktivität reduziert ?

Zusammenfassend zeigten diese Versuche, daß die Ethylenproduktion in verschiedenen Gewebetypen der Baumwollpflanze durch cellulolytische Enzyme stimuliert werden kann.

4. Die Rolle der Gibberelline bei der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung

4.1. Material und Methoden

4.1.1. Belichtungsbedingungen

Für die Belichtungsversuche zur Blühinduktion wurde ein Aggregat mit 16 parallel angeordneten Weißlichtröhren der Marke Osram 258/21, Lumilux white, verwendet. Mit dieser Anordnung wurde eine Beleuchtungsstärke von ca. 11 000 Lux erreicht. Der Abstand zwischen Lichtquelle und Versuchspflanzen (oberer Topfrand) betrug ca. 1.20 m. Die Temperatur der Belichtungskammer wurde konstant auf $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ gehalten, die Luftfeuchtigkeit betrug 70-80 %. Das Pflanzmaterial war 2-3 Monate alt und wurde bis zum Versuchsbeginn strikt im Kurztag von 8-10 Stunden gehalten.

Während der Induktionsversuche mit Weißlicht wurden die Pflanzen mit Dauerlicht bestrahlt und nach Versuchsende zur Nachreaktion wiederum unter Kurztagbedingungen gehalten.

4.1.2. Extraktion, Reinigung und Auftrennung der Gibberelline von Hyoscyamus niger in Vorstufen, freie Säuren und an Zucker gebundene Konjugate

Diese 1983 von Koshioka et al. vorgestellte Methode (Abb. 4) zur Extraktion von Gibberellinen aus pflanzlichem Material, weist entscheidende Vorteile gegenüber den bisher verwendeten Verfahren auf. So können mit dieser Methode auch kleine Mengen (0.5-1.0 g Trockengewicht) Pflanzenmaterial effektiv aufgetrennt werden. Die Reinigung über C 18 RP-Säulenmaterial ist zeitsparender als Auftrennungen über PVP (Hiraga et al., 1972) oder Aktivkohle (Durley et al., 1971; Zeevaart, 1971). Es werden keine salzhaltigen Extraktionspuffer verwendet und somit große Schwankungen des pH-Wertes vermieden. Dies schützt die labilen freien Gibberellinsäuren und die Konjugate.

Für die Extraktion wurde 1 g gefriergetrocknetes Blattmaterial von H.n. in drei Schritten mit insgesamt 40 ml 80 % MeOH (v/v) in der Reibschale homogenisiert. Das Homogenat wurde filtriert und die Reibschale mit 2 x 5 ml 80 % MeOH gespült. Der pH-Wert des Rohextraktes wurde mit 3 N NH_4OH bzw. 3 N HCl auf pH 6.0-6.5 eingestellt. Der pH- Wert des Rohextraktes von H.n. war stets leicht basisch.

Im nächsten Reinigungsschritt wurde eine 30 ml Glasspritze mit 5 passenden Filterpapierblättchen und 3 g C_{18} -Reverse Phase Bondapak Säulenmaterial gefüllt. Den Abschluß bildeten zwei Filterpapierblättchen.

Diese Säule trennt Chlorophyll, Carotinoide und andere unpolare Komponenten des Rohextraktes ab. Der Rohextrakt wurde mit einer Pasteurpipette aufgetragen und mit Preßluft durchgedrückt (rasch tropfender Fluß: 2-4 ml/Min.).

Das Volumen des Eluats wurde bestimmt, auf 50 % MeOH mit dest. Wasser verdünnt und wiederum der pH-Wert eingestellt.

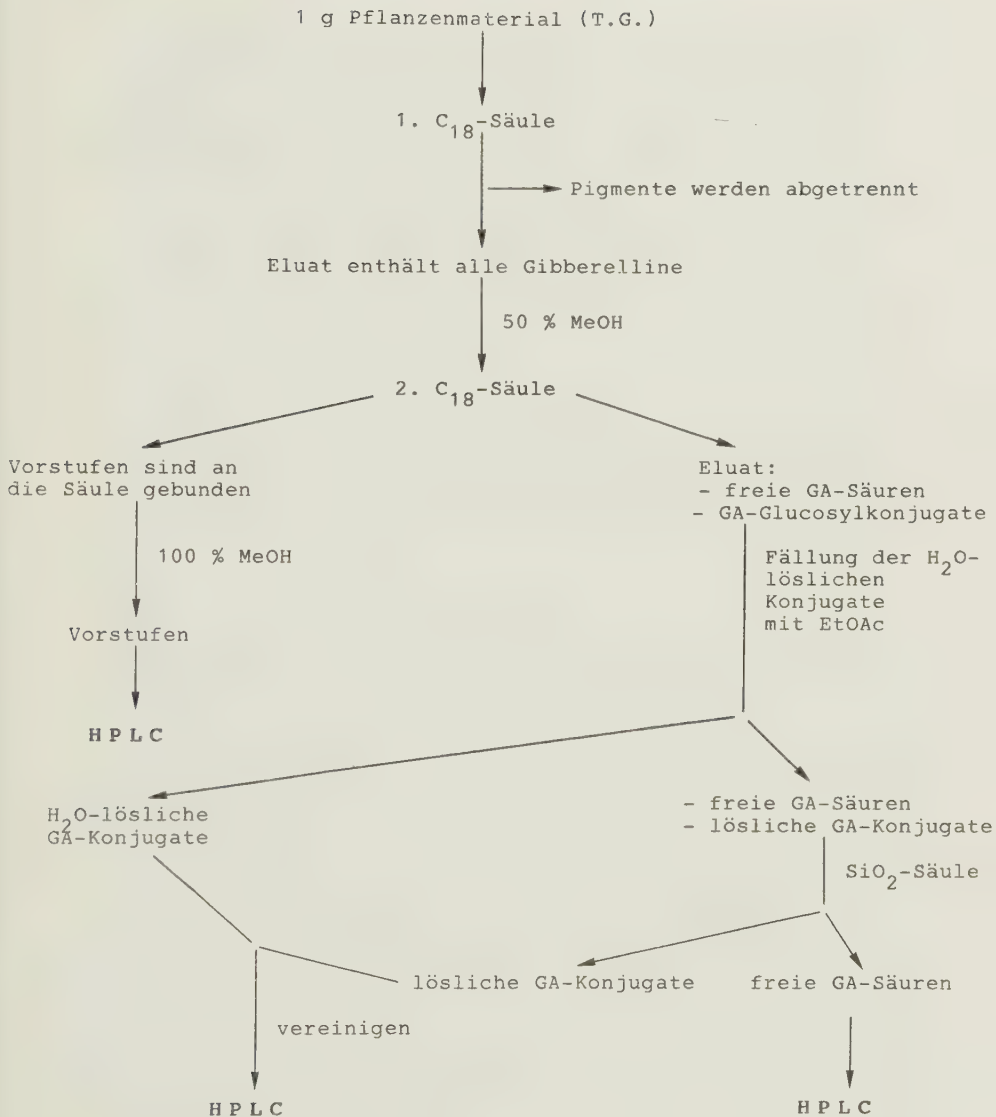


Abb.4:
Extraktionsschema zur Gewinnung von freien Gibberellin-
säuren, Vorstufen und Konjugaten aus Blättern von
Hycoscyamus niger

Über eine zweite Säule, identisch zur ersten, wurden die weniger polaren Komponenten, die Vorstufen, von den freien Säuren und Konjugaten getrennt. Dazu wurde das Eluat auf die Säule aufgetragen. Zuerst wurde die Fraktion der freien Säuren und Konjugate in einem Rundkolben gesammelt, bei ca. 35°C eingedampft und bei -70°C aufbewahrt. Die Säule war nun noch mit den Vorstufen beladen. Mit einem Überschuß von 50-60 ml 100 % MeOH wurden sie von der Säule eluiert, eingedampft und ebenfalls bei -70°C gelagert.

Die Vorstufen der Gibberelline waren nach diesen ersten Trennungsschritten soweit aufgereinigt, daß sie mittels HPLC in die einzelnen Komponenten aufgetrennt werden konnten. Die spezielle Vorbereitung der Proben für die Auftrennung mittels HPLC wird unter 4.1.3. genau beschrieben.

Von der Fraktion der freien Säuren und Konjugate wurden im nächsten Schritt die unlöslichen Zuckerkonjugate abgetrennt. Zu dem eingedampften Eluat der 2. Bondapak-Säule wurde 1 ml dest. Wasser gegeben und der Rückstand weitgehend gelöst. Weitere 49 ml absoluten Methanols und 50 ml Ethylacetat wurden mit einer Pasteurpipette zugegeben und dabei die Kolbenwand gründlich gespült. Während dieses Vorganges flockten die unlöslichen Konjugate aus. Der Niederschlag wurde über Whatman Nr.1 Filterpapier abgetrennt, das Filtrat eingedampft und der gesamte Vorgang noch einmal wiederholt. Das Filterpapier mit den wasserunlöslichen Konjugaten wurde im Kühlschrank aufbewahrt.

Im letzten Reinigungsschritt wurden die freien Gibberellinsäuren von den wasserlöslichen Konjugaten getrennt. Dazu wurde mit 1 ml dest. Wasser und 1 ml 100 % Methanol der eingedampfte Rückstand des Filtrats gelöst und auf 1 g Celite (Kieselgel, Partikelgröße 0.020-0.045 mm) übertragen.

Das Celite wurde im warmen, nicht zu starken Luftstrom getrocknet. Der Spülvorgang wurde noch zweimal wiederholt. Zwischen den einzelnen Schritten wurde das Celite jeweils vollständig getrocknet. Der Trocknungsvorgang nimmt mit steigender Zahl der Spülungen mehr Zeit in Anspruch. Das Celite wurde jedoch nur völlig trocken weiterverwendet. Es dient als Trägersubstanz für die aufzutrennende Probe.

Die endgültige Trennung von freien Säuren und Konjugaten erfolgte an einer Kieselgelsäule (Woelm Kieselgel : Partikelgröße 32-100 μm ; mesh size 1.50-470; Säule: 470 mm x 14 mm). Das Kieselgel wurde vor seiner Verwendung zu 20 % (w/w) mit dest. Wasser versetzt; der Behälter stand dabei in einem Eisbad, um die bei der Adsorption freigesetzte Wärme zu kompensieren. Der Behälter wurde anschließend mit Parafilm verschlossen und auf einem Rundschüttler (15 Runden pro Stunde) ca. 14 Tage geschüttelt. Dadurch sollte eine gleichmäßige Verteilung der Feuchtigkeit erreicht werden. Das so vorbereitete Kieselgel wurde in der Kühlkammer gelagert.

Vor dem Einfüllen des Säulenmaterials wurde die Säule mehrmals mit einem Lösungsmittelgemisch aus Ethylacetat : Hexan = 10 : 90 (v/v) gespült. Mit diesem Gemisch wurde auch das Kieselgel aufgeschlämmt. Die einzelnen Komponenten dieses Gemisches, wie auch die der Trennflüssigkeit, wurden ca. 1 Stunde vor Beginn des Trennvorganges mit 0.5 M Ameisensäure gesättigt. Abschluß des Säulenmaterials bildet jeweils ein Filterpapier. 5 g des Kieselgels wurden in die Säule eingefüllt; den Flüssigkeitsspiegel ließ man bis auf ca. 3 cm über die Kieselgeloberfläche absinken.

Mit einem Spatel wurde die an Celite gebundene Probe auf die Säule aufgetragen. Mit der Trennlösung Ethylacetat : Hexan = 95 : 5 (v/v) wurde gespült und ca. 100 ml gesammelt. Die restliche Flüssigkeit wurde mit Preßluft aus der Säule

entfernt, das Eluat einrotiert und bei -70°C gelagert. Diese Fraktion enthielt die freien Säuren.

Die Säule war nun noch mit den löslichen Konjugaten beladen. Mit ca. 100 ml 100 % Methanol wurden sie von der Säule gelöst, das Eluat mit 3 N NH_4OH neutralisiert, eingedampft und bei -70°C gelagert.

4.1.3. Chromatographische Verfahren zur Auftrennung der einzelnen Gibberellinfraktionen aus pflanzlichem Material

In der Literatur der letzten zwanzig Jahre werden zahlreiche Methoden zur Extraktion und Aufreinigung von Gibberellinen beschrieben. Erkenntnisse, daß Gibberelline an wichtigen, physiologischen Vorgängen beteiligt sind, erhöhten das Interesse an der Identifizierung der einzelnen Gibberelline, ihrer Vorstufen und der gebundenen Formen.

Mit dünnenschichtchromatographischen Methoden (Kagawa et al., 1963; Cavell et al., 1967) konnten die Gibberelline nicht zufriedenstellend aufgetrennt werden; außerdem ist diese Methode mit hohem Materialverlust verbunden. Kieselgeladsorptionschromatographie (Kalifah et al., 1965) oder Säulenchromatographie mit Aktivkohle-Celite (Durley et al., 1971) oder PVP (Glenn et al., 1972) besitzen nur geringes Auflösungsvermögen. Zudem sind diese Verfahren sehr zeitaufwendig, da gerade durch die Verwendung von Materialien wie Aktivkohle und PVP zusätzliche Reinigungsschritte nötig werden. Die Auftrennung an einer Sephadexsäule liefert gute Resultate für Gibberelline, die sich in ihrem chromatographischen Verhalten sehr ähneln, gruppiert die Gibberelline jedoch nicht in Vorstufen und freie Säuren (Pitel et al., 1971). Als Alternative wurde die Verteilungschromatographie an einer Kieselgelsäule vorgestellt

(Durley et al., 1972). Diese Methode erwies sich als sehr effektiv für die Auftrennung von gibberellinähnlichen Substanzen und die chromatographische Analyse endogener Gibberelline (Ruddat et al., 1968; Crozier et al., 1968; 1971).

Jedoch auch diese Technik weist grundlegende Schwächen auf, welche ihre Anwendung begrenzen. So ist es hier nötig, den Verteilungskoeffizienten eines jeden Gibberellins für ein spezielles Lösungsmittelgemisch zu ermitteln, um größere Verluste zu vermeiden. Diese Koeffizienten überschneiden sich zum Teil in weiten Bereichen in einem Trennsystem, was wiederum keine eindeutige Auftrennung in die zu Beginn erwähnten drei Fraktionen zuläßt. Und schließlich sind die relativ labilen freien Säuren und Konjugate bei dieser Methode extremen pH-Schwankungen ausgesetzt.

Koshioka bot mit seiner verbesserten Extraktionsmethode auch eine Möglichkeit an, die Fraktionen der freien Säuren, Vorstufen und Konjugate in ihre Einzelkomponenten aufzutrennen.

Für die HPLC-Auftrennung der Fraktionen wurde folgendes System von Waters verwendet: Universalinjektor U6K, 2 ml Probenschleife, 2 Doppelkolbenpumpen 6000 A, Hochdruckgradientensystem mit Mischkammer, Flußraten- bzw. Gradientenprogrammierer 660. Aus den am HPLC-Gerät möglichen Trennmethode n wählte er die Reverse Phase-Chromatographie aus. Ihr Vorteil gegenüber anderen Chromatographieverfahren liegt darin, daß sie für mittelpolare bis stark polare Verbindungen, die in Wasser und Alkoholen gut löslich sind, besonders geeignet ist. Die Reverse Phase-Chromatographie trennt Moleküle aufgrund einer Kombination von Löslichkeitsparametern, Polarität und Verteilungskoeffizienten. Im Gegensatz zur "normalen" Chromatographie ist die stationäre

Phase unpolar (hydrophob) und die stärkste Retention erfolgt aus dem polarsten Eluenten, nämlich Wasser. Durch Verminderung der Polarität der mobilen Phase, z.B. durch Zugabe von Methanol, wird die Retention verringert. Als Elutionsmittel werden daher Gemische aus Wasser und niederen Alkoholen eingesetzt.

Als Trennsäule wurde die μ Bondapak C_{18} Reverse Phase Säule (3.9 mm x 300 mm) von Waters verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Säule, bei der Silikagel (Typ μ Porasil) mit unpolaren Monochloralkylsilanen, Kettenlänge : 18 C, oberflächenmodifiziert wurde.

Da die aufzutrennenden Proben Gemische unterschiedlich polarer Substanzen und damit Gemische von Substanzen unterschiedlicher Retentionszeit waren, umfaßten die Proben einen weiten Bereich an Kapazitätsfaktoren.

Um dennoch eine effektive Auftrennung zu erreichen, wurde mit einem Hochdruckgradientensystem ($H_2O/MeOH$) gearbeitet; das heißt, jede Pumpe fördert eine andere mobile Phase und liefert einen definierten Anteil an der Gesamtflußrate.

Für die Auftrennung der Vorstufen (Abb. 5a) und der freien Säuren (Abb. 5b) wurden folgende Gradienten verwendet. Für die HPLC-Trennungen wurde glasdestilliertes entgastes Methanol und entgastes bidest. Wasser verwendet. Letzteres war zu 1 % mit Essigsäure versetzt. Durch den leicht sauren Charakter der mobilen Phase konnte die Selektivität des Trennsystems erhöht werden.

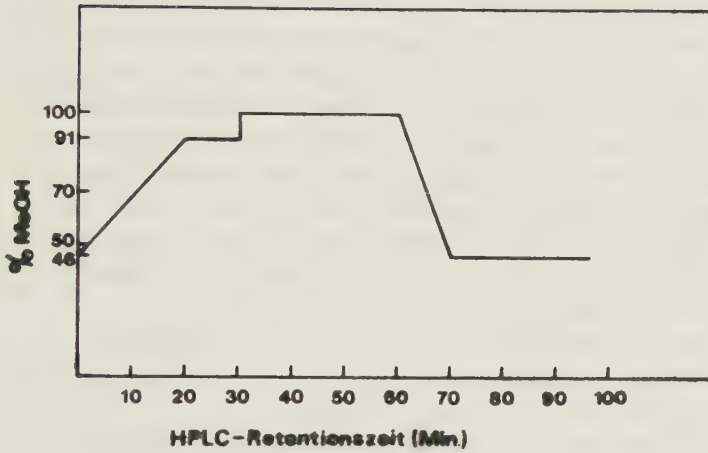


Abb.5a:
MeOH/H₂O-Gradient zur Auftrennung der Gibberellinvorstufen
mittels HPLC

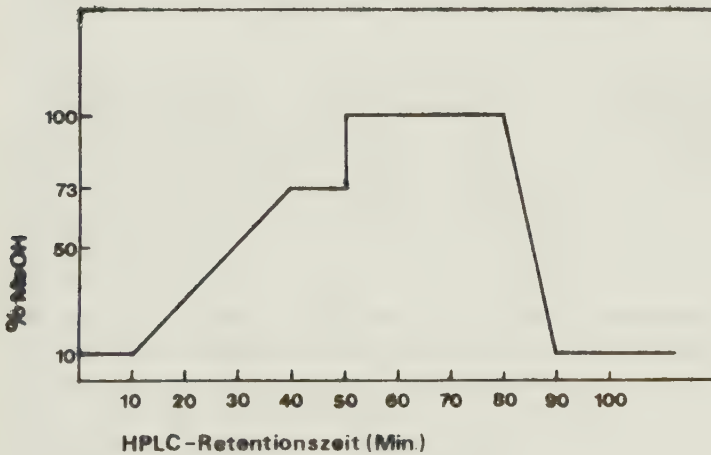


Abb.5b:
MeOH/H₂O-Gradient zur Auftrennung der freien Gibberellinsäuren
mittels HPLC

In den vorausgegangenen Anreicherungs-schritten waren die einzelnen Fraktionen weitgehend gereinigt worden. Für die HPLC-Auftrennung wurden sie folgendermaßen aufbereitet: Alle Fraktionen wurden, nachdem sie einige Stunden bei -70°C gelagert worden waren, am Gefriertrockner getrocknet. Zunächst wurde jede Fraktion in 2ml des Lösungsmittelgemisches gelöst, das zu Beginn des jeweiligen Gradienten verwendet wird. Anschließend wurden die Fraktionen mittels kurzer PVP-Säulen von phenolischen Verbindungen gereinigt und schließlich über das Microfilter-System von Millipore (Porengröße: $0.45\ \mu\text{m}$) filtriert. Die löslichen und unlöslichen Konjugate wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgetrennt.

Vor der HPLC-Auftrennung der Proben wurden in regelmäßigen Abständen Testläufe mit ^3H -markierten Vorstufen und freien Säuren durchgeführt, um die Trennleistung der Säule zu kontrollieren. Die Schwankungen der Retentionszeit lagen in einem tolerierbaren Bereich von ± 1 Minute.

4.1.4. Der Microdrop-Bioassay als Nachweismethode für freie Gibberellinsäuren und Gibberellin-Vorstufen

Ein Vergleich der für den Nachweis von Gibberellinen in Frage kommenden Biotests (Crozier et al., 1970) zeigt, daß der Microdrop-Bioassay aufgrund seiner hohen Sensitivität (bis $10^{-4}\ \mu\text{g}$) über ein weites Spektrum der bekannten Gibberelline und seiner schnellen Reaktion, die geeignete Nachweismethode ist (Murakami, 1968a).

Dieser von Murakami (1968b) entwickelte Biotest an Reis-pflanzen basiert auf dem verstärkten Längenwachstum des 2. Blattes nach Gibberellin-Applikation. Testpflanze ist der Dwarf-Reis "Tan-ginbozu". Dabei handelt es sich um eine Reissorte mit genetischem Block im Gibberellin-

Biosyntheseweg zwischen Mevalonsäure und Kauren. Native Gibberelline sind nicht vorhanden und applizierte Mevalonsäure hat kein Längenwachstum zur Folge (Suge und Murakami, 1967). Nach insgesamt 96 Stunden Anzucht der Reispflanzen war das Keimblatt vollentwickelt und die Spitze des 2. Blattes zu sehen. Nun wurde mit einer Hamilton Microliterspritze 0,5 µl Testlösung in die Beuge zwischen erstes und zweites Blatt appliziert. Auf Uniformität der Keimlinge wurde geachtet.

Nach weiteren 48 Stunden in der Anzuchtkammer (Anzuchtbedingungen siehe 4.1.4.1.) wurde die Länge des Reispflänzchens von der Oberfläche des Kornes bis zur Spitze des nun voll entwickelten zweiten Blattes gemessen. Neun Reispflanzen wurden jeweils mit der gleichen Testlösung behandelt.

4.1.4.1. Anzucht von *Oryza sativa*

Für den Biotest zum Nachweis der Gibberelline wurde der Dwarf-Reis "Tan-ginbozu" verwendet (Murakami, 1968a). Reiskörner wurden für 48 Stunden submers in mit dest. Wasser gefüllten Petrischalen angekeimt. Eine Sterilisation des Samenmaterials und des später verwendeten Nährmediums erwies sich als unnötig. Die Anzucht erfolgte in einer Anzuchtkammer mit Dauerlicht (ca. 7000 Lux, Osram 258 W/21, weiß Lumilux) und konstanter Temperatur von 28 bis 30°C. Das Wasser in den Schalen wurde zweimal täglich gewechselt.

Inzwischen wurden für die weitere Anzucht des Reises Rollrandgläschen (Ø 2.5 cm, Höhe 4 cm) mit 1 %iger Agarlösung (Serva, Puder reinst) gefüllt (15 ml) und bis zu ihrer Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

Nach zwei Tagen war die Koleoptile der Reiskörner gut sichtbar (mindestens 2 mm lang) und die Keimlinge wurden, jeweils drei pro Gläschen, derart auf die Oberfläche des

Agars gesetzt und leicht angedrückt, daß die Längsachse des Korns horizontal lag und die Koleoptile aus dem Agar herausragte. Auf Uniformität der Keimlinge bezüglich der Länge der Koleoptile wurde geachtet. Anschließend wurden die Reispflanzen unter den oben beschriebenen Bedingungen gehalten. Zusätzlich wurde mit einem Luftbefeuchter 80 % Luftfeuchtigkeit eingestellt. In regelmäßigen Abständen wurden die Keimlinge mit dest. Wasser besprüht.

Nach weiteren 48 Stunden war das erste Blatt voll entwickelt und die Spitze des zweiten zu sehen. In diesem Stadium wurden die Pflanzen für den Biotest verwendet.

4.1.5. Aufstellung einer Eichkurve für den Microdrop-Bioassay und Diskussion seiner Signifikanz

Parallel zu den Biotests der einzelnen HPLC-Fraktionen wurden verschiedene Verdünnungen einer GA_3 -Standardlösung getestet: $10^{-1} - 10^{-5}$; $2.5 \times 10^{-1} - 2.5 \times 10^{-5}$; $3.3 \times 10^{-1} - 3.3 \times 10^{-5}$; $5 \times 10^{-1} - 5 \times 10^{-5}$ μg GA_3 /0.5 μl Testlösung. Diese Standardlösungen wurden wie die HPLC-Fraktionen, an jeweils 9 Reispflanzen getestet; aus den neun gemessenen Werten wurde der Mittelwert gebildet. In Tab.4 wurden diese Mittelwerte aus insgesamt 40 Biotests mit Standardlösungen nochmals gemittelt, eine Eichkurve erstellt und als Berechnungsgrundlage der in den Kapiteln 4.2.2.1, 4.2.2.2. und 5.2.2.1., 5.2.2.2. präsentierten Ergebnisse verwendet. Ohne dieses Bezugssystem wäre eine Quantifizierung der extrahierten Gibberelline nicht möglich. Der Vergleich mit den von GA_3 bewirkten Längenänderungen ist dadurch gerechtfertigt, daß der Microdrop-Test auf eine große Anzahl von Gibberellinen gleich sensitiv antwortet.

Bei der Aufstellung der Eichgeraden ($y = a + b \ln x$; Abb.6) wurden die Werte ab $10^{-2} \mu g$ GA_3 /0.5 μl nicht mehr berücksichtigt, weil

der Biotest, wie auch von Katsumi (1968) berichtet wurde, bei höheren Konzentrationen keine lineare Beziehung mehr zeigt. Außerdem wurden in den hier beschriebenen Versuchen mit Gibberellinextrakten aus *Hyoscyamus* niemals derartig hohe Konzentrationen festgestellt.

Als signifikant wurde eine Längenänderung betrachtet, die sich in den Biotests aller Versuche mit identischen Belichtungsbedingungen in vergleichbarer Intensität wiederholte. Als relative Längenzunahme wurde der Längenunterschied gegenüber den in jedem Biotest mitgeführten Kontrollen gewertet. Kontrollen waren unbehandelte Reispflanzen und solche, denen MeOH bzw. EtOH appliziert worden war. Aus diesen 3 Kontrolltypen wurde wiederum ein Mittelwert gebildet und als Vergleichswert eingesetzt. Wie aus Tab. 4 hervorgeht, betrug dieser Wert im Mittel 2.0 cm. In den Biotests der extrahierten Gibberelline wurden Längenzunahmen von 0.5 - 0.7 cm im Sinne der oben beschriebenen Signifikanz beobachtet. Längenzunahmen, die sich deutlich von den Kontrollen unterschieden, jedoch nur in vereinzelten Versuchen zu beobachten waren, wurden als nicht signifikant eingestuft.

Nach diesen Betrachtungen zur Signifikanz des Biotests soll noch kurz auf die Problematik der Identifizierung der Gibberelline im Reistest eingegangen werden. Im Biotest wurde in einzelnen Fraktionen Aktivität festgestellt; auf Grund der Fraktionsnummer war auch die Retentionszeit der jeweiligen Probe bekannt. Aus der Literatur (Koshioka et al., 1983) kann für das in dieser Arbeit verwendete Trennsystem nicht immer einer Retentionszeit nur ein bestimmtes Gibberellin zugeordnet werden; strukturelle Gemeinsamkeiten ermöglichen in manchen Fällen keine höhere Auflösung.

Tab. 4:

Kontrollen des Microdrop-Biotests: GA₃-Standardlösungen, unbehandelte Reispflanzen, 100 % MeOH, 95 % MeOH.

Diese Werte ($\bar{x}$) errechnen sich aus 40 durchgeführten Biotests; die Standardabweichung wurde nach der Formel $\sigma = \sqrt{\text{Var} \times \frac{N}{N-1}}$, (Var = Varianz = $\frac{\sum y_i^2}{N} - \frac{(\sum y_i)^2}{N^2}$; y = Mittelwert; N = Anzahl der Versuche) ermittelt.

GA ₃ -Konz.	10 ⁻⁵	2.5x10 ⁻⁵	3.3x10 ⁻⁵	5x10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	2.5x10 ⁻⁴	3.3x10 ⁻⁴	5x10 ⁻⁴	10 ⁻³	2.5x10 ⁻³	3.3x10 ⁻³	5x10 ⁻³	10 ⁻²	2.5x10 ⁻²	3.3x10 ⁻²	5x10 ⁻²	10 ⁻¹	2.5x10 ⁻¹	3.3x10 ⁻¹	5x10 ⁻¹	unbehand. Pflanzen	100% MeOH	95% EtOH
	2.2	2.3	2.2	2.4	2.5	2.4	2.5	2.6	2.7	2.6	2.7	2.8	2.9	3.0	2.9	3.2	3.5	3.7	3.7	3.9	2.0	2.0	2.0
	0.10	0.11	0.10	0.13	0.15	0.12	0.13	0.12	0.11	0.09	0.09	0.14	0.14	0.13	0.15	0.18	0.16	0.15	0.09	0.10	0.08	0.09	0.09

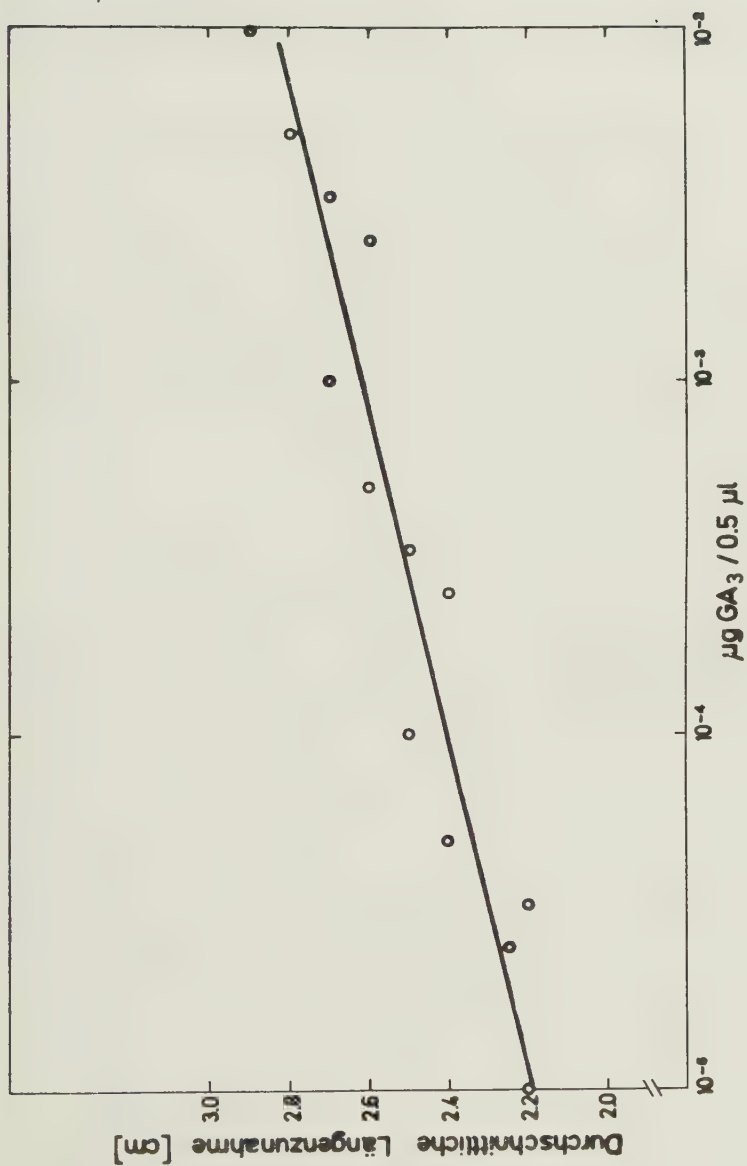


Abb. 6: Eichkurve der GA₃-Standarddeichlösungen

Die Weiterentwicklung der analytischen Methoden gestattete die strukturelle Aufklärung einer ständig wachsenden Zahl von Gibberellinen. Generell werden die Gibberelline in zwei Gruppen eingeteilt: Gibberelline mit 19 und solche mit 20 C-Atomen. Die C₂₀-Gibberelline repräsentieren wohl in erster Linie Intermediate auf dem Syntheseweg von GA₁₂-Aldehyd zu den C₁₉-Gibberellinen (Jones und MacMillan, 1984).

Die Funktion der verschiedenen Strukturtypen der C₁₉-Gibberelline ist noch in der Aufklärung. Aus den bisher gewonnenen Erkenntnissen muß zwischen Gibberellinen in höheren Pflanzen und in Pilzen unterschieden werden. Charakteristisch für pflanzliche Gibberelline ist die Hydroxylierung in Position 1 β , 2 β oder 15 β und in Position 11 und 12, die einzigen bisher bekannten Ausnahmen sind GA₅₄ und GA₅₅.

Für Pilze sind Hydroxylierungen in Stellung 1 α , 2 α oder 16 α typisch, Ausnahme ist hier GA₁₆. 3 β - und 13-hydroxylierte Gibberelline wurden in beiden Gruppen gefunden.

Versucht man, eine Beziehung zwischen Struktur und biologischer Aktivität herzustellen, so zeigt sich nach Auswertung verschiedener Bioassays (Crozier et al., 1970), daß Nicht-Hydroxylierung, 3 β und 13-Hydroxylierung mit hoher biologischer Aktivität gekoppelt sind. 2 β -hydroxylierte GAS zeigen wenig oder gar keine Aktivität in Biotests (Sponsel und MacMillan, 1977). Hydroxylierung in dieser Position scheint ein natürlicher und irreversibler Prozeß zu sein, um die Inaktivierung hormonell aktiver GAS zu steuern. Diese GAS werden anschließend entweder zu ungesättigten Ketonen oxidiert oder zu Glucosiden konjugiert. Beide Prozesse können nebeneinander ablaufen, wie z.B. in Samen von *Pisum sativum* (Sponsel und MacMillan, 1977) jedoch mit unterschiedlicher Intensität.

4.2. Ergebnisse

4.2.1. Photoperiodische Reaktion von Hyoscyamus niger auf Dauerweißlicht

Die Sensitivität der Versuchspflanzen auf den Faktor Dauerlicht wurde unter den in Abschnitt 4.1.1. beschriebenen Versuchsbedingungen getestet. Hyoscyamus wurde bis zu einem Alter von circa neun Wochen im Kurztag herangezogen und für die Versuche 1, 2, 3, 4, 5 und 7 Tage dauerbelichtet. Nach den einzelnen Belichtungszeiten wurde für die späteren Gibberellinextraktionen Pflanzenmaterial geerntet und zugleich eine Pflanzengruppe ins Gewächshaus zurückgebracht und dort weiterhin im Kurztag gehalten. Nach weiteren 6-7 Wochen wurden die Pflanzen auf den Ansatz von Blütenanlagen untersucht.

Tab.5: Induktion der Blütenbildung bei Hyoscyamus niger durch Dauerlichtbehandlung

Dauerbelichtung (Stunden)	Blütrate (%)	Blattanzahl (pro Pflanze) bis zum ersten Blüten- primordium
24	0	--
48	47	36
72	100	23
96	100	19
120	100	18
168	100	18

Tab. 5 zeigt die Reaktion von *Hyoscyamus niger* gegenüber Dauerweißlicht und die Korrelation von Blühinduktion und der bis zum ersten Blütenprimordium gebildeten Blätter. Bereits nach 2 Tagen Dauerlicht war ein Teil der Pflanzen induziert; eine vollständige Induktion der Blütenbildung wurde jedoch erst bei 72 Stunden erreicht. Parallel zur Induktion der Blütenbildung nahm die Zahl der neuentwickelten Blätter ab. Diese hohe Empfindlichkeit von *Hyoscyamus niger* gegenüber photoperiodischer Behandlung macht diese Pflanze für Untersuchungen über den Mechanismus der Blühinduktion besonders geeignet.

Es konnte vermutet werden, daß eventuelle Veränderungen im Hormonhaushalt bei der photoperiodischen Induktion innerhalb der induktiven Phase ablaufen. Die Möglichkeit, den Vorgang der Induktion auf wenige Tage zu begrenzen, ließ erwarten, daß solche Änderungen deutlicher hervortreten - und deshalb auch besser nachzuweisen sind - als bei Pflanzenarten, bei denen eine längere photoperiodische Behandlung zur Induktion der Blütenbildung notwendig ist.

4.2.2. Qualitative und quantitative Veränderungen im Gibberellinmuster während der Blühinduktion

4.2.2.1. Freie Gibberellinsäuren

In Anlehnung an die Ergebnisse aus den Belichtungsversuchen wurde zunächst der Gibberellin Gehalt in Blattproben bestimmt, die 1, 2, 3 und 4 Tage nach Beginn der kontinuierlichen Belichtung geerntet worden waren. Ein Extraktions- bzw. Auftrennungsvorgang lieferte jeweils drei Fraktionen: Freie Säuren, Vorstufen und an Zucker gebundene Säuren, die Glucosylkonjugate. Letztere wurden in der vorliegenden Arbeit nicht einzeln identifiziert; dies hätte die Anwendung weiterer Meßtechniken, wie z.B. Massenspektrometrie erfordert.

Die Ergebnisse der ersten Versuche ließen eine Erweiterung der zeitlichen Verteilung sinnvoll erscheinen. Deshalb wurden zusätzlich auch Pflanzen nach 2 1/2, 3 1/2, 5 und 7 Tagen Dauerweißlicht untersucht.

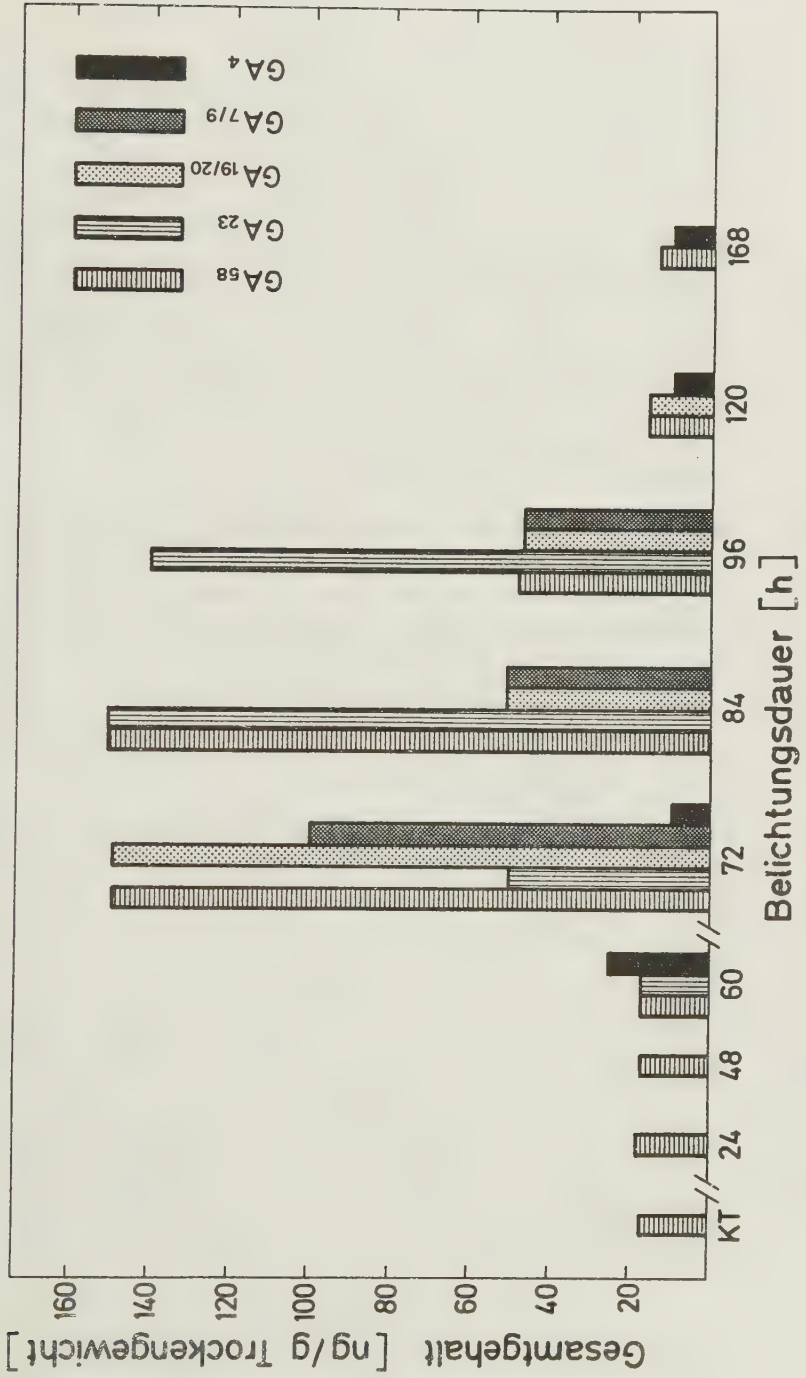
Tab.6 zeigt zunächst die Resultate für die Fraktion der freien Säuren nach unterschiedlicher Belichtungsdauer. Neben GA₅₈, das unter allen Belichtungsbedingungen und auch im KT nachweisbar war, konnten zusätzlich einige freie Säuren identifiziert werden, die erstmals nach bestimmten Dauerlichtgaben auftraten. Nach 24 bzw. 48 Stunden Dauerweißlicht ist das Gibberellinmuster unverändert; obwohl nach 2 Tagen bereits 47 % der Pflanzen induziert sind, konnten im Biotest keine als signifikant zu bezeichnende Veränderungen festgestellt werden. Nach 60 Stunden kontinuierlicher Belichtung wurde im Biotest in zwei, nach 72 Stunden in vier Proben gibberellinähnliche Aktivität beobachtet. Aus dem Vergleich der Retentionszeiten dieser Proben mit Angaben in der Literatur (Koshioka et al., 1983) konnten den einzelnen Proben die freien Säuren 4, 23, 19 bzw. 20 und 7 bzw. 9 zugeordnet werden. Bei den zuletzt genannten Gibberellinen ist mit den zur Verfügung stehenden Mitteln keine genaue Identifizierung möglich.

Verbunden mit den qualitativen Veränderungen im Gibberellinmuster ist eine drastische Steigerung des Gibberellinspiegels während des Induktionsvorganges (Tab.6 und Abb.7). Das stets vorhandene GA₅₈ erfährt bei einsetzender Induktion eine beträchtliche Steigerung. Ebenso erreichen alle während der Induktionsphase identifizierten freien Gibberellinsäuren quantitativ zum Zeitpunkt der vollständigen Induktion ihr Maximum. Im weiteren Verlauf wird das Spektrum der freien Säuren zunächst erhalten; erst nach weiteren 48 Stunden reduziert sich der Gehalt an freien Säuren wieder nahezu auf den Ausgangswert.

Tab. 6: Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Fraktion der freien Gibberelliinsäuren (GA₃), nach unterschiedlicher Belichtungsdauer (die Fraktion der Vorstufen wurde separat aufgetrennt, deshalb wurden unterschiedliche Mengen injiziert)

Belichtungs- dauer (h)	in das HPLC injizierte Menge (ml)	Freie Gibberelliinsäuren	ng GA/g Trockengewicht (bez. auf GA ₃ -Eichkurve)
KT-Kontrolle	1.60 1.50	58 58	17.5 18.7
24	1.50 1.70 1.55 1.45	58 58 58 58	18.7 16.5 18.1 19.3
48	1.65 1.60	58 58	17.0 17.5
60	1.45 1.50	GA ₄ : 1.55 GA ₄ : 1.49	19.3 18.7
72	1.60 1.65 1.57 1.60	GA ₄ : 1.45 GA ₄ : 1.25 GA ₄ : 1.40 GA ₄ : 1.45	150.0 145.5 152.9 150.0
84	1.50 1.65	23 23	50.6 160.0
96	1.67 1.75	23 23	50.6 145.5
120	1.75 1.90 1.70 1.80	GA ₄ : 1.45 GA ₄ : 1.40 GA ₄ : 1.42 GA ₄ : 1.45	16.0 14.7 16.5 15.6
168	1.90 1.85 1.95	GA ₄ : 1.25 GA ₄ : 1.35 GA ₄ : 1.60	14.7 15.1 10.4

Abb. 7:
Zusammensetzung der Fraktion der freien Gibberellinsäuren in H.n. nach
unterschiedlicher Belichtungsdauer



Mit Hilfe des höchst sensitiven Reistests war es also möglich, qualitative und quantitative Veränderungen im Gibberellin Gehalt während der Blühinduktion zu erfassen. Die vergleichsweise geringe Menge an freien Säuren im KT wird innerhalb kurzer Zeit auf das circa 25-fache erhöht. Ein Vergleich der Blühhöhen aus den Belichtungsversuchen und den Veränderungen im Gibberellinspiegel zeigt die Parallelität dieser beiden Vorgänge. 72 Stunden kontinuierliche Belichtung sind der Schwellenwert für eine vollständige Induktion und gleichzeitig erreicht der Gibberellinspiegel seinen Höhepunkt.

4.2.2.2. Gibberellinvorstufen

Parallel zu den freien Säuren wurden auch die Vorstufen mittels eines speziell hierfür entwickelten Gradienten (Koshioka et al., 1983) aufgetrennt. Zu den Gibberellinvorstufen gehören Kauren, Kaurensäure, GA_{12} -Aldehyd und verschiedene kaurenähnliche Verbindungen. Das C_{19} -Gibberellin GA_4 wird im Auftrennungsvorgang in der Fraktion der Vorstufen gewonnen; es wurde jedoch in die Berechnungen der freien Säuren miteinbezogen (Tab.6, Abb.7).

Quantitativ betrachtet, zeigt sich in der Fraktion der Vorstufen, wie bei den freien Gibberellinsäuren, ein beträchtlicher Anstieg nach 60 Stunden Dauerbelichtung (Tab.7). Mittels Reistest konnten Kauren und Kaurensäure identifiziert werden. Nachdem bei kürzeren Belichtungszeiten nur Kaurensäure nachgewiesen werden konnte, deren Menge dann drastisch zunimmt (60 und 72 h), taucht nach 72 h Dauerbelichtung Kauren in bereits großen Mengen auf und bleibt bis zum 96 h-Wert auf etwa dem gleichen Niveau erhalten. Kaurensäure sinkt dagegen ab 84 h wieder unter die Nachweisgrenze. Der Anstieg im Gesamtgehalt deutet auf eine erhöhte de-novo-Synthese hin, die sich auch in der quantitativen Steigerung der freien Säuren widerspiegelt.

Tab.7: Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Gibberellinvorstufen nach unterschiedlicher Belichtungsdauer mit Dauer-Weißlicht
(KA $\hat{=}$ Kaurensäure; K $\hat{=}$ Kauren)

Belichtungsdauer (h)	in das HPLC inji- zierte Mengen (ml)	Vorstufen		ng GA-Vorstufe/g Trockengewicht (bez. a. GA ₃ Eichkurve)
		-	-	
KT-Kontrolle	1.80	-	-	
24	1.50	KA		9.3
	1.45	KA		9.7
	1.60	KA		8.8
	1.50	KA		9.3
48	1.51	KA		9.3
	1.55	KA		9.0
60	1.55	KA		77.4
	1.49	KA		27.2
72	1.45	KA	K	9.7
	1.25	KA	K	96.0
	1.40	KA	K	85.7
	1.45	KA	K	82.8
84	1.27		K	
	1.25		K	96.0
96	1.30		K	92.3
	1.40		K	85.7

Als Zusammenfassung der Ergebnisse sind in Abb. 8 noch einmal die quantitativen Veränderungen im Gibberellinhaushalt dargestellt.

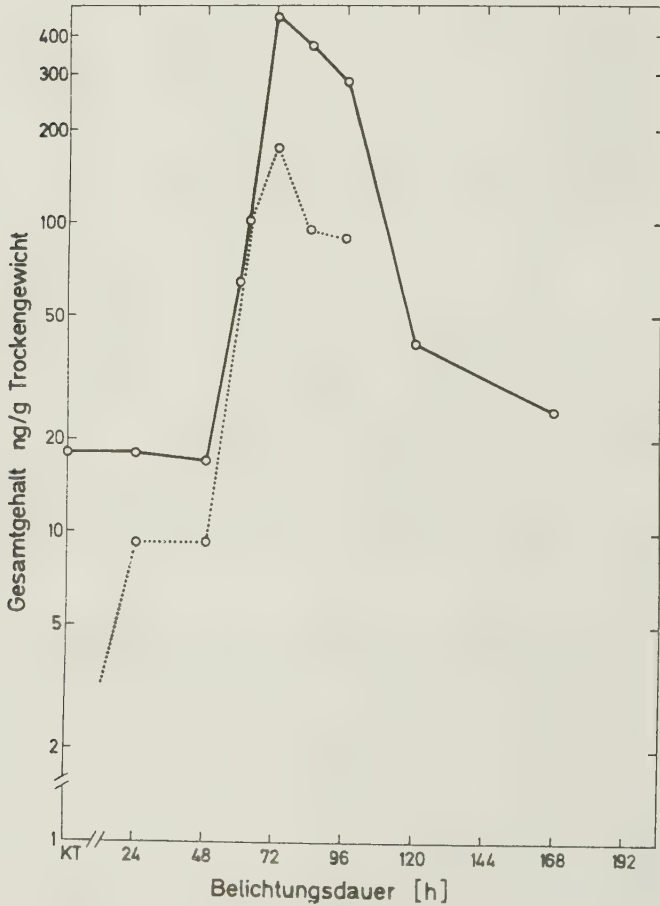


Abb.8:
Quantitative Veränderungen im Gibberellinhaushalt während der photoperiodischen Blühinduktion
○—○ Freie Gibberellinsäuren
●—● Gibberellinvorstufen

5. Einfluß von UV-B-Strahlung auf den Gibberellinhaushalt während der Blühinduktion bei Hyoscyamus niger

5.1. Belichtungsbedingungen

In diesen Experimenten zur Untersuchung des Effekts von UV-B auf die Blühinduktion wurde Weißlicht mit zusätzlichem UV-B als Dauerbestrahlung angewendet. Als Strahlungsquellen für den mittleren UV-Bereich von 280-320 nm wurden UV-Röhren der Marke Philips TL 12/W40 verwendet.

Prof. Tevini von der Universität Karlsruhe stellte uns freundlicherweise sein Quantenspektrometer zur Verfügung, um die Strahlungsstärke der verwendeten Röhren bei wechselnden Versuchsanordnungen zu ermitteln. Wie das Emmissionsspektrum einer dieser Röhren zeigt (Abb.9), wird auch noch Licht im kurzwelligen UV-C Bereich emittiert. Unsere Versuche sollten jedoch mit gänzlich UV-C freiem Licht durchgeführt werden; es war also nötig, einen geeigneten Filter zu entwickeln, der die kurzwelligen UV-Bereiche (UV-C) abschneidet und die Belichtungsstärke der Weißlichtröhren dennoch nicht wesentlich reduziert. Nach entsprechenden Testreihen mit verschiedenen Materialien und Chemikalien ergaben die besten Ergebnisse die Kombination mit einem Filter aus Cellophanfolie (Einnachfolie, Fa. Kraft), die mit entsprechenden Substanzen getränkt war. Dazu wurden die einzelnen Bahnen der Einnachfolie in

einer Lösung von Uridin (20 mg/ml) eingeweicht und anschließend derart aufgehängt, daß überschüssige Lösung ablaufen konnte. Im trockenen Zustand wurden die Bahnen untereinander verbunden und über einen Holzrahmen gespannt, der den Filter stets im gleichen Abstand (ca. 30 cm) zu den Versuchspflanzen hielt. Diese Behandlung lieferte UV-C freies UV-B für die Belichtungsversuche.

Zum kurzwelligen Bereich schneidet dieser Filter bei 284 nm ab. Damit treffen auf unsere Versuchspflanzen auch Wellenlängen auf, die unter natürlichen Bedingungen bisher nur in extremen Höhen gemessen wurden. Da jedoch nicht bekannt ist, welche Wellenlängen auf den von uns untersuchten physiologischen Ablauf am effektivsten bzw. am schädlichsten sind, wurde versucht die per Definition festgelegte untere Grenze des UV-B weitgehend einzuhalten. Unter UV-B wird deshalb in künftigen Beschreibungen ein Bereich im ultravioletten Spektrum verstanden, der bei 280 nm beginnt. Zunächst sollte die Toleranz der Pflanzen gegen zusätzliche UV-B-Bestrahlung vor allem im Hinblick auf eine Beeinflussung der Blütenbildung geklärt werden. Die in den Versuchen verwendeten unterschiedlichen Belichtungsintensitäten wurden erreicht, indem die UV-B-Röhren mit ein bzw. zwei Lochplatten aus Aluminiumblech mantelförmig umhüllt wurden, und, wenn nötig, auch der Abstand von Pflanzen zu Röhren variiert wurde. Abb. 9 zeigt verschiedene, mit dem Quantenspektrometer aufgenommene Spektren der für die Versuche verwendeten Zusatzbestrahlung mit UV-B.

Abb. 9:
Spektrum einer UV-B-Röhre (Typ Philips TL 12/W 40), gemessen mit einem Quantenspektrometer:
a) in 60 cm Abstand, ungefiltert
b) in 60 cm Abstand mit 1 Lochplatte
c) in 60 cm Abstand mit 2 Lochplatten



5.2. Ergebnisse

5.2.1. Einfluß von UV-B-Strahlung verschiedener Intensitäten auf die Blühinduktion

Als Voraussetzung für die Untersuchungen zu möglichen durch UV-B bedingten Veränderungen im Gibberellinhaushalt, mußte eine Intensität von UV-B gefunden werden, die von der Pflanze ohne äußerlich sichtbare Schäden ertragen wird. Die zumindest äußerlich intakte Pflanze ist eine Vorbedingung für weitere Experimente, weil sichtbare Schädigungen am Habitus der Pflanze auf eine Beeinträchtigung der pflanzlichen Entwicklung schließen lassen würden und damit ein Einfluß auf die Blütenbildung unter Umständen nur ein Sekundäreffekt einer allgemeinen Schädigung sein könnte.

In den im Folgenden beschriebenen Versuchen wurden verschiedene Pflanzengruppen zusätzlich zum induzierenden Weißlicht mit jeweils einer bestimmten Intensität von UV-B bestrahlt. Mit Hilfe der unter 5.1. beschriebenen Anordnungen wurden 100, 300 und 1000 mW UV-B/m² eingestrahlt. Unter dem Aspekt, daß eine vollständige Induktion bei Hyoscyamus durch 72 Stunden Dauerlicht erreicht wird, wurden Belichtungszeiten von 1 bis 8 Tagen gewählt.

Die in Tab. 8 zusammengestellten Ergebnisse zeigen, daß zusätzliche UV-B-Bestrahlung einen verzögernden Einfluß auf die Blühinduktion hat. So liegt die Blütrate nach einer vergleichbaren Belichtungsdauer bei jeder der drei genannten UV-B-Intensitäten deutlich unter den Blürraten mit Weißlicht allein. Was die sichtbare, äußere Schädigung der Pflanzen betrifft, zeigten die Pflanzen, die mit 1000 mW UV-B/m² bestrahlt wurden, bereits nach zwei Tagen einen sogenannten Bronzierungeffekt. Diese Braunfärbung der Blätter wurde bereits von Benda (1955) als Folgereaktion nach UV-Bestrahlung beschrieben. Es wird vermutet, daß dieser Effekt auf

Tab.8: Sensitivität von Hyoscyamus niger gegenüber Dauerweißlicht und verschiedenen Intensitäten UV-B

Belichtungsdauer (h)	Blüßrate (%) Weißlicht + UV-B				Weißlicht
	100 m W/m ²	300 m W/m ²	1000 m W/m ²		
24					0
48					47
72	22	0		0	100
96		3			100
120		19			
144	79	46		28	
168		70			
192		78			
		75			

einer gesteigerten Tanninproduktion oder der Bildung von Kork- und Holzzellen unter der abgestorbenen Epidermis beruht. Damit schied diese Intensität für die weiteren Versuche aus. In den folgenden Experimenten wurde deshalb mit einer Intensität von 300 mW/m^2 gearbeitet, die, beurteilt man nur das äußere Erscheinungsbild der Pflanze nach der Bestrahlung, noch tolerierbar war. Aus diesem Grunde finden sich die Mehrzahl der Ergebnisse in Tab. 8 bei Versuchen mit 300 mW/m^2 . Im weiteren wurden die Bestrahlungen mit dieser Intensität auch auf längere Zeiträume ausgedehnt.

Vergleicht man die Wirkung der drei Intensitäten untereinander, so zeigt sich, daß die Induktion trotz des induktiven Weißlichtes intensitätsabhängig verzögert wird und, wie die Werte für 300 mW UV-B/m^2 zeigen, wohl niemals die im "nur Weißlicht" erzielten Blühsraten erreicht. Auch mit längeren Belichtungsperioden war die Schädigung durch das UV-Licht im Hinblick auf die Induktion der Blütenbildung nicht auszugleichen. In den im Folgenden dargestellten Versuchen über den Einfluß von UV-B auf den Gibberellinhaushalt wurde immer eine UV-B-Intensität von 300 mW/m^2 verwendet, eine Intensität, die einerseits einen möglichst großen Einfluß erwarten ließ, aber andererseits keine sichtbaren Schäden verursachte.

5.2.2. Einfluß von UV-B auf den Gibberellinhaushalt

5.2.2.1. Freie Gibberellinsäuren

In den Belichtungsversuchen mit Dauerweißlicht konnte das C_{19} -Gibberellin GA_{58} unter allen Belichtungsbedingungen - auch im Kurztag - nachgewiesen werden. Die Vermutung, daß GA_{58} zur Grundausstattung von H.n. gehört, liegt nahe. In Tab. 9 sind die Ergebnisse aus den Versuchen mit zusätzlicher UV-B-Bestrahlung dargestellt. GA_{58} war in Versuchen mit UV-B erst nach 72 Stunden langer Belichtung nachweisbar. Von den

Tab. 9: Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Fraktion der freien Gibberellinsäuren nach unterschiedlicher Belichtungsdauer mit Weißlicht und zusätzlichem UV-B

Belichtungs- dauer (h)	in das HPLC in- jizierte Menge (ml)	Freie Gibberellinsäuren	ng GA/g Trockengewicht (bezogen auf GA ₃ -Eichkurve)
24	1.60	- - - - -	
48	1.55	- - - - -	
72	1.60 1.60 1.60 1.60	58 - - - - - - - - - - - - - - -	17.5
96	1.55 1.50 1.60	58 58 58	18.1 18.7 17.5
120	1.60 1.75 1.90	58 58 58	18.1 18.7 17.5
144	1.45 1.65 1.56	58 58 58	50.6 46.3 42.6
168	1.38 1.90	58 58	19.3 49.1 52.0
192	1.45 1.60	58 58	20.3 42.6
			19.3 17.5

anderen im Weißlicht identifizierten freien Säuren waren nur GA₇ bzw. GA₉ und GA₄ belegbar. GA₇ bzw. GA₉ wurden erstmals nach 96 Stunden langer Belichtung gefunden. In den Versuchen mit UV-B-Bestrahlung fehlt GA₂₃ gänzlich, ebenso GA₁₉ bzw. GA₂₀. Zur Verdeutlichung der durch UV-B-Bestrahlung induzierten Veränderungen, sind in Tab. 10 die Ergebnisse mit und ohne zusätzliche UV-B-Behandlung gegenübergestellt.

Auch was die Quantität der Gibberelline betrifft, zeigen sich deutliche Unterschiede. GA₅₈ nimmt mit steigender Induktionsrate zu, erreicht aber mengenmäßig niemals den Wert im Dauerweißlicht. Gleiches gilt für GA₇ bzw. GA₉. Ebenso, wie die Blühinduktion durch UV-B verzögert und in ihrem Ausmaß reduziert wird, ist der Gibberellinspiegel deutlich reduziert. Für die Induktion von Bedeutung erscheinen GA₅₈ und GA₇ bzw. GA₉. Verspätet und in geringen Mengen werden sie auch unter UV-B-Bestrahlung synthetisiert und sind für eine deutliche, jedoch unvollständige Induktion charakteristisch.

Tab.10: Vergleich des Gehaltes an freien Gibberellinsäuren im Dauerweißlicht und unter zusätzlicher UV-B-Bestrahlung (Vergleich von Tab. 6 und 9)

Belichtungs- dauer (h)	Weißlicht		Weißlicht + UV-B	
	Freie Säuren	Gesamtgehalt (ug/g Trockeng.)	Freie Säuren	Gesamtgehalt (ug/g Trockeng.)
KT	58	18.1		
24	58	18.2		
48	58	17.3		
60	58; 23; 4	64.7		
72	58; 23; 19 / 20; 7 / 9; 4	460.5	58	17.5
84	58; 23; 19 / 20; 7 / 9;	370.1		
96	58; 23; 19 / 20; 7 / 9;	282.6	58	44.8
120	58; 19 / 20; 4	41.2	58	62.5
144			58	68.1
168	58; 4	24.9	58	31.5
192			58	18.4

5.2.2.2. Gibberellinvorstufen

Für den Induktionsvorgang charakteristische qualitative Veränderungen zeichnen sich unter UV-B-Einfluß nicht ab. Wie bereits in den Versuchen mit Dauerweißlicht, erfahren die Vorstufen parallel zur Synthesesteigerung der freien Säuren eine quantitative Erhöhung (Tab.11). Diese Steigerung ist jedoch gegenüber den Ergebnissen ohne UV-B-Bestrahlung drastisch geringer. Den Vorstufen scheint einzig die Aufgabe zuzukommen, Syntheseausgangsprodukte für die freien Säuren anzuliefern.

In Abb. 10 wird nochmals verdeutlicht, welche drastischen quantitativen Unterschiede im Verlauf des Induktionsvorganges mit und ohne zusätzliche UV-B-Bestrahlung bestehen. Der Gesamtgibberellingehalt ist unter UV-B-Konditionen auf ca. 15 % des Maximalwertes im Dauerweißlicht reduziert.

Tab.11: Gehalt an Gibberellinvorstufen während der Blühinduktion mit Dauerweißlicht und Dauer-UV-B

Belichtungsdauer (h)	in das HPLC inji- zierte Mengen	Vorstufen		ng GA-Vorstufe/g Trocken- gewicht (bez.auf GA ₃ - Eichkurve)
24	1.70	-	-	
48	1.55	-	-	
72	1.85	-	-	
96	1.60	KA	K	8.8
	1.40	KA	K	10.0
120	1.55	KA	K	9.0
	1.60	KA	K	8.8
144	1.55	KA		9.0

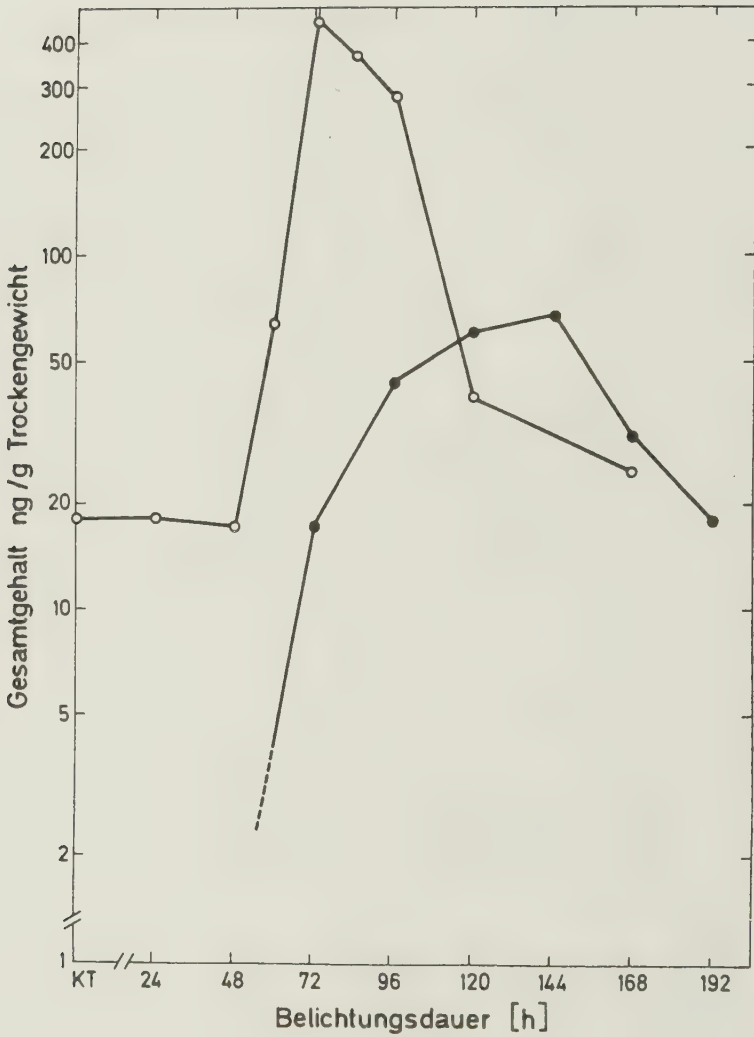


Abb.10:
Quantitative Unterschiede im Gibberelliningehalt während
der Blühinduktion mit Dauerweißlicht oder Dauerweißlicht
und UV-B:
○—○ Gibberellinsäuren im Weißlicht
●—● Gibberellinsäuren im Weißlicht + UV-B

6. Diskussion

Ethylen ist in Pflanzen unter natürlichen Bedingungen charakteristisch für Alterungsprozesse und Reifeperioden in Früchten. Durch seine autokatalytische Wirkung werden die zu Reife und Abscission von Pflanzenorganen führenden Vorgänge verstärkt und beschleunigt. Diese Effekte sind in der intakten Pflanze nur in bestimmten Entwicklungsphasen zu beobachten. Das Schadinsekt *Pseudatomoscelis seriatus* löst diese Kettenreaktionen in Baumwollpflanzen aus und verursacht dadurch erhebliche Schäden. Es induziert in einzelnen Teilen der Pflanze eine Steigerung der Ethylenproduktion und täuscht damit einen Reifezustand vor, der von der Pflanze entwicklungsphysiologisch noch nicht erreicht ist. Die Pflanze reagiert auf diesen Reiz mit den für den Alterungs- und Reifeprozess charakteristischen Reaktionen: zellwandabbauende Enzyme werden aktiviert, der Zellverband aufgelöst und die Abscission eingeleitet.

In früheren Jahren wurde versucht, die Schäden durch *Pseudatomoscelis* durch Anwendung von Insektiziden niedrig zu halten. Sekundäreffekte dieser Chemikalien auf das Ökosystem und nicht zuletzt die steigenden Kosten riefen das USDA-Projekt ins Leben. Ziel war es, den Induktionsvorgang wie auch das ethylensynthetisierende System in der befallenen Pflanze zu charakterisieren. Veröffentlichungen

über andere Schadinsekten und bereits durchgeführte Untersuchungen an infizierten Baumwollpflanzen lieferten wichtige Anhaltspunkte für das Vorgehen. Die Beobachtung, daß *Pseudatomoscelis* stets mit bestimmten Pilzen und einem Bakterienstamm auf Baumwollpflanzen vergesellschaftet ist, machte Experimente mit sterilen *Pseudatomoscelis*kulturen nötig, weil möglicherweise die gesteigerte Hormonproduktion auf die Microorganismen zurückzuführen ist.

Favorisiert wird jedoch die Hypothese, daß *Pseudatomoscelis* selbst die Hormonproduktion anregende Substanzen an die Pflanze abgibt. Anlaß dazu geben Untersuchungen an der Gattung *Lygus*. Hier konnten Amylase, Protease, Pectinase, Aminosäuren und Phytohormone in der Speichelflüssigkeit identifiziert werden (Tingey und Pillemer, 1977).

Hydrolytische Enzyme wie Cellulasen oder Lipasen, erhöhen bekanntlich die Ethylenproduktion (Guinn, 1977). Die Untersuchungen zur Sensitivität der Baumwollpflanzen, im speziellen der befallenen Gewebetypen, gegenüber dieser Enzymklasse, sollten deshalb zur Aufklärung der Regulationskette beitragen. Mit der Infiltrationsmethode wurde ein Cellulase-Präparat an das jeweilige Gewebe verabreicht und nach bestimmten Inkubationszeiten die Ethylenproduktion gaschromatographisch bestimmt.

In allen untersuchten Gewebetypen wurde eine beträchtliche Steigerung der Ethylensynthese beobachtet. Weiterhin wurde deutlich, daß die befallenen Gewebetypen während einer längeren Periode ihrer Entwicklung hochsensitiv reagieren und damit unter natürlichen Bedingungen besonders gefährdet sind. Durch die Injektion eines die Hormonsynthese steigern den Faktors werden Gewebeverbände erfaßt, die in ihrem physiologischen Zustand nicht auf diese Synthese vorbereitet sind und daher mit einer Streßreaktion antworten. Inwieweit die in diesen Versuchen gemessenen Ethylenmengen in der

intakten Pflanze zur Abscission des entsprechenden Organs führen würden, kann nicht beurteilt werden.

Sollten cellulolytische Enzyme in der Speichelflüssigkeit des Insekts gefunden werden, so wäre ein Zusammenhang zwischen Schädling - Ethylenproduktion - Abscission in Baumwollpflanzen hergestellt. Es wäre denkbar, daß *Pseudatomoscelis* kleine Bezirke im Gewebeverband mit cellulolytischen Enzymen infiziert, von denen aus der Abbau der Zellwandstrukturen und die damit verbundenen enzymatischen Veränderungen eingeleitet werden.

Experimente mit einem hochgereinigten Cellulase-Präparat und dem Hemmstoff 2-Deoxy-D-Glucose sollten zur Identifizierung des induzierenden Faktors beitragen. Da jedoch Infiltrationen mit dem gereinigten Enzympräparat nahezu identische Ergebnisse lieferten und durch DDG keine Hemmung erfolgte, kann die Glucansynthetase nicht allein für die ausgelöste Hormonproduktion verantwortlich sein. Der Effekt, der mit DDG und dem Präparat Cellulysin beobachtet wurde könnte darin liegen, daß auch noch andere cellulolytische Enzyme in ihrer Aktivität beeinträchtigt werden.

Seit der Aufstellung der "Florigen" ("Blühhormon")-Hypothese durch Chailakhyan (1936) wurde und wird intensiv an der Identifizierung einer solchen Substanz gearbeitet. Obwohl überzeugende physiologische Beweise für die Existenz eines entsprechenden Stoffes vorliegen (Lang, 1965), sind alle diesbezüglichen Unternehmungen bis heute erfolglos geblieben. Nachdem bei einigen Pflanzenarten durch Gibberelline Blütenbildung unter photoperiodisch nicht-induktiven Bedingungen induziert werden konnte, wurde den Gibberellinen in der Diskussion um die chemische Natur des Blühhormons in einigen Pflanzen eine blüh-

fördernde und oft sogar die blühinduzierende Wirkung zugeschrieben. Dieser Effekt beschränkt sich jedoch in der Mehrzahl der untersuchten Fälle auf LTP oder vernalisationsbedürftige Pflanzen und nur einige wenige KTP. Zum Teil konnten mit den applizierten Gibberellinen nur unvollständige Induktionen ausgelöst werden und die vorrangige Rolle der Gibberelline wurde daher in der Sproßstreckung gesehen.

In fast allen entsprechenden Versuchen wurden die wenigen, in größeren Mengen zur Verfügung stehenden Gibberelline auf Pflanzen appliziert und ihre Induktionswirkung festgestellt. Besonders das aus Pilzen in großen Mengen gewonnene und deshalb einzige käufliche Gibberellin, GA_3 , kam häufig zur Anwendung. Nachdem aber in vielen Versuchen gar keine oder nur unvollständige Induktion der Blütenbildung beobachtet wurde, verloren die Gibberelline in der Diskussion an Bedeutung. Mittlerweile konnte jedoch mit exakten Nachweismethoden gezeigt werden, daß GA_3 in höheren Pflanzen sehr wahrscheinlich nicht synthetisiert wird. Der Umstand, daß es in vielen Fällen nicht induzierend wirkte, erlaubt also keineswegs die Schlußfolgerung, Gibberelline wären nicht an der Blühinduktion beteiligt.

Grundgedanke vieler Untersuchungen zur Blühinduktion war, immer weitere Stoffklassen an möglichst vielen Pflanzenarten zu testen und dabei der Identifizierung des Florigens näherzukommen.

Untersuchungen an *Hyoscyamus niger* zeigten, daß auch bei dieser Pflanze mit GA_3 nur eine unvollständige Induktion erreicht werden kann (Warm, 1980). Der Induktionsvorgang bei *Hyoscyamus* hat den Charakter eines "Lichtschalter-Mechanismus". Ist die Induktionsschwelle, die benötigte Zahl von Langtagen erreicht, wird die Blütenbildung ausgelöst und kann auch durch anschließende Behandlung mit Kurztag nicht mehr revertiert werden. Diese Reaktions-

weise ließ Hyoscyamus als erfolgversprechenden Kandidaten für eine andere Art von Versuchen zur Aufklärung der Rolle der Gibberelline bei der Blütenbildung erscheinen, die Zeevaart (1983) vorgeschlagen hat: Es sollte versucht werden, den endogenen Gehalt und die Wirkung induktiver Tageslängen auf den Gibberellin-Metabolismus in den Blättern zu bestimmen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß mit der photoperiodischen Induktion ein drastischer Anstieg des Gibberellin-Gehaltes der Blätter verbunden ist. Bei der qualitativen Aufschlüsselung ergab sich, daß außer dem auch im Kurztag vorhandenen GA_{58} die weiteren freien Gibberellinsäuren GA_{23} , GA_4 , GA_{19} bzw. GA_{20} und GA_7 bzw. GA_9 auftreten. Daraus kann der Schluß gezogen werden, daß durch die Dauerbelichtung eine kräftige Steigerung der Gibberellinsynthese induziert wird. Diese Schlußfolgerung wird durch den Befund unterstützt, daß gleichzeitig die Gibberellinvorstufen Kaurensäure und Kauren auftreten, die im Kurztag nicht nachweisbar sind.

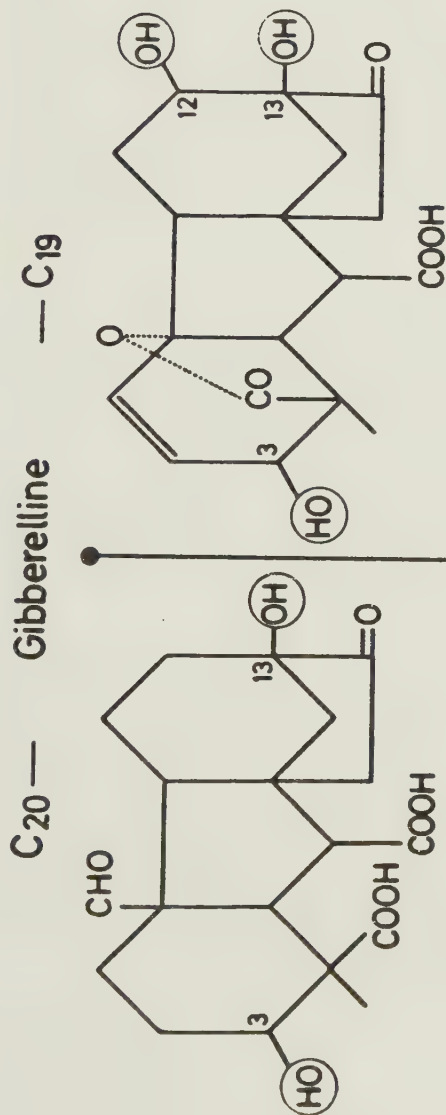
Wie verschiedene Arbeiten gezeigt haben (Jones und Zeevaart, 1980; Picciarelli und Alpi, 1985; Davies et al., 1985), scheinen bestimmte Gibberelline für eine bestimmte Pflanzenart spezifisch zu sein; es wurde nie das gesamte oder ein größerer Teil des Spektrums in einer Art gefunden. Dies könnte auch die Unwirksamkeit oder die geringe Wirksamkeit von GA_3 erklären, weil mit einem artspezifischen Gibberellinmuster sicher auch ein bestimmter Biosyntheseweg verwirklicht ist. Der Syntheseweg über Mevalonsäure und Kauren zu GA_{12} -7-Aldehyd, dem ersten Zwischenprodukt, mit der Gibberellin-Ringstruktur, ist vermutlich allen Pflanzen gemeinsam. GA_{12} -7-Aldehyd ist Verzweigungspunkt zu den verschiedenen Gibberellinen. Aus Untersuchungen an Cucurbita Endosperm (Hedden et al., 1983), Pisum sativum (Kamiya und Graebe, 1983) und Gibberella fujikuroi (Evans und Hanson, 1975) geht hervor, daß verschiedene Synthesewege von

diesem Punkt ausgehen können. Wesentliche Unterschiede sind Position und zeitliche Reihenfolge der Hydroxylierungsschritte, sowie die Aufeinanderfolge von Hydroxylierung, Eliminierung eines C-Atoms und Einziehung einer Doppelbindung. Kamiya (1985) hat in diesem Zusammenhang ein interessantes Modell über mögliche Reaktionswege im Gibberellin-Metabolismus veröffentlicht, mit der Schlußfolgerung, daß vom Verzweigungspunkt aus mehrere Reihen von Biosyntheseschritten biochemisch möglich sind.

Abb. 11 zeigt die strukturellen Unterschiede der in *Hyoscyamus niger* identifizierten Gibberelline. GA_{23} und GA_{19} gehören zu den C_{20} -Gibberellinen. Allgemein wird ihnen nur die Rolle von Zwischenprodukten zwischen GA_{12-7} -Aldehyd und den C_{19} -Gibberellinen zugesprochen, ihre biologische Aktivität ist meist geringer. GA_{19} wurde auch im Syntheseweg von *Pisum sativum* Samen (Kamiya und Graebe, 1983) als Vorstufe des C_{19} -Gibberellins GA_{20} gefunden. Von den C_{19} -Gibberellinen wurden bereits GA_4 , GA_9 , GA_{20} und GA_{58} in höheren Pflanzen identifiziert. Im Falle des GA_7 und GA_9 wurde verschiedentlich ein Überwiegen des GA_7 in höheren Pflanzen erwähnt (Zeevaart, 1985).

Angeichts der Tatsache, daß in verschiedenen Pflanzenarten jeweils verschiedene Gibberellinmuster gefunden wurden und verschiedene Biosynthesewege möglich sind, kann die Zuordnung der in H.n. identifizierten Gibberelline zu einem bisher bekannten Biosyntheseweg nur spekulativ sein. Auffällig ist jedoch, daß alle bei Dauerbelichtung neu nachweisbaren Gibberelline eine Hydroxylierung in 3- und/oder 13-Stellung haben.

Bei all diesen Betrachtungen muß daran erinnert werden, daß im Reis-Biotest nur in größeren Mengen vorhandene Gibberelline nachgewiesen werden können und, daß deshalb eventuelle Zwischenprodukte, die rasch umgesetzt werden und sich deshalb nicht anhäufen, nicht erfaßt werden.



GA 23 = 3, 13 - (OH)
GA 19 = 13 - (OH)

GA 9 = ohne - (OH) , ohne Doppelb.
GA 20 = 13 - (OH) , ohne "
GA 58 = 3, 12 - (OH) , ohne "
GA 4 = 3 - (OH) , ohne "
GA 7 = 3 - (OH) , mit "

Die Resultate der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente legen nahe, den Gibberellinen eine aktive Beteiligung an der Induktion der Blütenbildung zuzusprechen. Das zeitliche Zusammenfallen von Blühinduktion und Anstieg der Gibberellinbiosynthese läßt einen kausalen Zusammenhang vermuten. Geht man von der in einigen Fällen bereits bestätigten Hypothese aus, daß für jede Pflanzenart ein bestimmtes Muster an freien Gibberellinsäuren charakteristisch ist, dann wäre zu untersuchen, ob in anderen, photoperiodisch reagierenden Pflanzenarten, ein ähnliches Muster bei der Blühinduktion einer der in H.n. vergleichbaren quantitativen Veränderung unterliegt.

In diesem Zusammenhang muß allerdings ein weiterer Befund der vorliegenden Arbeit interpretiert werden: Der hohe Gibberellin Gehalt der Blätter bleibt nur bis zu 4 Tagen im Dauerlicht erhalten und sinkt ab dem 5. Tag wieder deutlich ab. Dies ist deshalb ein zunächst erstaunlicher Befund, weil eine größere Zahl von Dauerlichttagen zwar die Blütrate nicht mehr erhöhen kann, aber den Einsatz des Schossens beschleunigt und die Zahl der Blütenanlagen erhöht; gerade die erstere Reaktion wird aber der Wirkung der Gibberelline zugeschrieben. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre die Annahme, daß durch die photoperiodische Induktion zunächst die Biosynthese der Gibberelline drastisch erhöht wird, diese aber nicht zum Vegetationspunkt transportiert werden. Erst nach einiger Zeit wird ein Transportsystem induziert, die Gibberelline werden aus dem Blatt ausgeschleust und dadurch sinkt auch bei hoher Syntheserate ihre Konzentration im Blatt. Ob diese Annahme zutrifft, könnte vielleicht mit Hilfe eines aus verschiedenen lang behandelten Blättern gewonnenen Enzymsystems zur Gibberellinbiosynthese geklärt werden.

Die Annahme eines solchen mit der Blühinduktion korrelierenden Transports zum Vegetationspunkt würde sehr gut zu einer Hypothese von Bernier et al. (1975) passen, der annimmt, daß es kein spezifisches "Florigen" gibt, sondern daß der Induktionsvorgang ein konzentrationsabhängiges Zusammenwirken der bereits bekannten Phytohormone ist. Diese Hypothese würde auch mehr der Erkenntnis gerecht, daß kaum ein Entwicklungsprozeß der Steuerung durch ein einziges Hormon unterliegt.

Die Untersuchungen zur Wirkung von UV-Strahlung auf die Blühinduktion von *Hyoscyamus niger* zeigten, daß ein für die Pflanze wichtiger Vorgang wie der Übergang zur Blütenbildung erheblich beeinflußt werden kann. Unter dem Einfluß von UV-B-Strahlung wird die Induktion in H.n. deutlich verzögert und erreicht nie das Ausmaß derjenigen im Weißlicht. Eine Untersuchung des Gibberellinmusters ergab, daß nur GA₅₈, GA₇ bzw. GA₉ und GA₄ in signifikanten Mengen gebildet werden.

GA₅₈ nimmt wie auch in den Weißlichtversuchen während der einsetzenden Induktion mengenmäßig zu, ebenso GA₇ bzw. GA₉. Sollte die Tatsache, daß ihre Quantität stark reduziert ist, der Grund dafür sein, daß nur eine Induktionsrate von circa 75 % erreicht wurde? GA₂₃ wurde unter UV-B-Einfluß in keinen nachweisbaren Mengen akkumuliert; das Gleiche gilt für GA₁₉ bzw. GA₂₀. Eine mögliche Interpretation, nämlich die, daß die Synthese von GA₂₃, GA₁₉ bzw. GA₂₀ für den Induktionsvorgang nicht maßgeblich ist, sondern allein GA₅₈ und GA₇ bzw. GA₉ für *Hyoscyamus niger* charakteristische Gibberellinsäuren bei der Blütenbildung sind, kann auf Grund der vorliegenden Befunde nicht schlüssig beurteilt werden.

Daß der Mechanismus der Synthesesteigerung und der Abnahme des Gibberellinspiegels auch bei unvollständiger Induktion in reduziertem Umfang abläuft, ist ein weiterer Hinweis für die enge Kopplung von Gibberellinhaushalt und Blühinduktion.

7. Zusammenfassung

1. Viele entwicklungsphysiologische Prozesse in Pflanzen werden von pflanzeneigenen Hormonen gesteuert. Die dabei ablaufenden Mechanismen sind nicht immer ausreichend geklärt, zumal es häufig zu einer Überlagerung hormoneller Effekte kommt und beobachtete Reaktionen nicht immer eindeutig einem Hormon zugeordnet werden können. Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von Ethylen und Gibberellinen an zwei konkreten Entwicklungsvorgängen zu studieren.
2. Das Schadinsekt *Pseudatomoscelis seriatus* verursacht in Baumwollpflanzen hohe Ertragseinbußen. Sein schädigender Einfluß liegt in der Steigerung der Ethylen-synthese. Die erhöhte Hormonproduktion hat schließlich die Abscission der befallenen Pflanzenteile zur Folge. Der Mechanismus dieses Induktionsvorganges sollte geklärt werden, um künftig gezielt gegen den Schädling vorgehen zu können. Ein Teilaspekt der Untersuchungen war die Klärung der Frage, inwieweit Kotyledonen, Blütenknospen und Früchte sensitiv auf cellulolytische Enzyme reagieren. Es wurde vermutet, daß das Insekt derartige Enzyme mit der Speichelflüssigkeit in die Pflanze injiziert.

3. Nach Infiltration der entsprechenden Gewebetypen mit Cellulase-Präparaten, konnte eine drastische Steigerung der Ethylensynthese beobachtet werden. Kotyledonen reagieren im Alter von 3-8 Tagen, Blütenknospen mit zunehmender Reife und Früchte im Alter von 25 Tagen extrem sensitv auf diese Behandlung.

Untersuchungen mit dem Glucansynthetase-Hemmstoff 2-Deoxy-D-Glucose ermöglichten keine eindeutige Aussage, ob es sich bei dem auslösenden Enzym um diesen Typus handelt, oder ob die beobachteten Effekte generell cellulolytischen Enzymen zuzuschreiben sind.

4. Bei der photoperiodischen Induktion der Blütenbildung soll in den Blättern die Synthese eines Blühstimulus, "Florigen" genannt, angeregt werden, der zum Vegetationspunkt transportiert wird und dort die Ausbildung von Fortpflanzungsorganen bewirkt.

In der Langtagpflanze *Hyoscyamus niger* wird mit kontinuierlicher Weißlichtbestrahlung bereits nach 72 Stunden eine vollständige Induktion der Blütenbildung erreicht.

5. Zur Aufklärung der chemischen Natur des Blühhormons wurden seit langem verschiedene chemische Verbindungen auf ihren induzierenden Einfluß hin untersucht. Interessante Ergebnisse wurden mit den primär als Streckungshormon wirkenden Gibberellinen erzielt. In einigen LTP und vernalisationsbedürftigen Pflanzen können sie die nötige Photoperiode bzw. die Kältebehandlung ersetzen. Für die Pflanzen, in denen Gibberelline keine Wirkung gezeigt hatten, wurde diskutiert, daß die wenigen zur Applikation zur Verfügung stehenden Gibberelline nicht spezifisch genug waren. Aus diesem Grunde sollten im Rahmen dieser Arbeit bei *Hyoscyamus* der endogene Gibberellengehalt sowie

qualitative und quantitative Veränderungen des Gibberellinspiegels während der Blühinduktion gemessen werden.

6. Dazu wurden nach verschiedenen Belichtungszeiten aus Blattproben von *Hyoscyamus niger* die Gibberelline extrahiert, aufgereinigt und in Vorstufen, freie Säuren und Konjugate aufgetrennt. Mittels eines HPLC-Gradientensystems wurden die Fraktionen aufgetrennt und in einem Biotest auf Aktivität geprüft.
7. Unter Kurztagbedingungen ist nur das Gibberellin GA₅₈ nachzuweisen. Unter photoperiodisch induktivem Dauerweißlicht nimmt seine Menge im Blatt ab 60 h nach Beginn der Behandlung drastisch zu und zusätzlich sind die Gibberelline GA₂₃, GA₄, GA₁₉ bzw. GA₂₀ sowie GA₇ bzw. GA₉ nachzuweisen. Der hohe Gibberellinspiegel bleibt von der 72. bis zur 96. Stunde erhalten und sinkt danach wieder auf den Wert unter Kurztagbedingungen ab. Auch der Gehalt der Blätter an den Gibberellinvorstufen Kaurensäure und Kauren zeigt ein ähnliches Verhalten.
8. In weiteren Versuchen wurde die Wirkung von UV-Strahlung vom Typ UV-B ($\lambda = 280-320$ nm) auf den Vorgang der Blühinduktion bei *Hyoscyamus niger* untersucht. Strahlung dieses Typs erreicht bei zunehmender Reduktion der Ozonschutzschicht die Erdoberfläche.

In Bestrahlungsversuchen mit einer UV-B-Intensität von 300 mW/m^2 ergab sich, daß die Blühinduktion verzögert wird und nur unvollständig erfolgt. Ebenso wie unter Dauerweißlicht-Bestrahlung wurde bei simultaner UV-B-Belichtung der Gibberellinspiegel mit einsetzender Induktion gesteigert. Quantitativ erreichte er jedoch nur einen Bruchteil der im Weißlicht gemessenen Werte.

Die qualitative Auswertung zeigte, daß unter UV-B-Einwirkung nur GA₅₈ und GA₇ bzw. GA₉ synthetisiert werden; die Synthese dieser freien Säuren setzte, wie die Blühinduktion, verspätet ein.

9. Aus den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnissen zur Rolle der Gibberelline bei der Induktion der Blütenbildung wird geschlossen, daß unter photo-periodisch induktiven Bedingungen (Dauerweißlicht) eine gesteigerte Biosynthese der Gibberelline erfolgt. Möglichkeiten der Erklärung für den nach längeren Belichtungszeiten wieder abnehmenden Gibberellengehalt, sowie für den Zusammenhang zwischen Gibberellinen und dem hypothetischen "Florigen" werden diskutiert.

8. Literaturverzeichnis

- Anderson, J.D., Mattoo, A.K. and M.Lieberman: Biochem. and Biophys. Research Communication Vol. 107 (2), 588-596 (1982).
- Benda, G.T.A.: Ann. appl. Biol. 43, 71-85 (1955).
- Bernier, G., Kinet, J.M., Jacqmard, A., Bodson, M. and Havelange, A.: XII. Intern. Bot. Congr. Abstr. Leningrad (1975).
- Biggs, R.H. and Kossuth, S.V.: In: UV-B biological and climate effects.s Research terrestrial FY 77. Impact of solar UV-B radiation on crop productivity. Final Report Feb. 1978, USDA-EPA, Washington D.C.
- Bogenrieder, A. und Klein, R.: Angew. Botanik 51, 99-107 (1977).
- Bünning, E.: Acad. Press, N.Y. (1963).
- Caldwell, M.M.: Ecological Monographs, Durham, N.C., 38, 243-268 (1968).
- Caldwell, M.M.: Photophysiology VI, 131-177 (1971).
- Cavell, B.D., MacMillan, J., Pryce, R.J. and Sheppard, A.C.: Phytochem. 6, 867-874 (1967).
- Chailakhyan, M.Kh.: Dokl. Acad. Sci. USSR: 12, 443-447 (1936).

- Chapman, S.: Mem. Roy. Meteorol. Soc. 3, 103 (1930).
- Crozier, A., Aoki, H. and R.P. Pharis: J. Exptl. Bot. 20, 786-795 (1969).
- Crozier, A., C.C. Kuo, R.C. Durley and R.P. Pharis: Can. J. Bot. 48, 867-877 (1970).
- Crozier, A., D.H. Bowen, J. MacMillan, D.M., Reid and B.H. Most: Planta 97, 142-154 (1971).
- Davies, J.K., Crozier, A., Jensen, E., Junttila, O. and L. Rivier: Plant Physiol. 78, 473-476 (1985).
- Denffer, D.von: Naturwiss. 37, 297-301, 317-321 (1950).
- Dickson, J.G. and Caldwell, M.M.: Am. J. Bot. 65, 857-863 (1978).
- Duffey, J.E. and Powell, R.D.: Am. Ento. Soc. Amer. 72, 599-601 (1979).
- Durley, R.C., MacMillan, J. and R.J. Pryce: Phytochem. 10, 1891-1908 (1971).
- Durley, R.C., Crozier, A., Pharis, R.P. and G.E. McLaughlin: Phytochem. 11, 3029-3033 (1972).
- Evans, L.T.: In: MacMillan, Melbourne, Australia (1969).
- Evans, R. and J.R. Hanson: J. Chem. Soc. Perkin I, 663-666 (1975).
- Garner, W.W. and Allard, H.A. : J. Agric. Res. 18, 553-603 (1920).
- Garner, W.W. and Allard, H.A. : J. Agric. Res. 23, 871-920 (1923).
- Glenn, J.L., C.C. Kuo, R.C. Durley and R.P. Pharis: Phytochem. 11, 345-351 (1972).
- Hedden, P., Graebe, J.E., Beale, M.H., Gaskin, P. and J. MacMillan: Phytochem., submitted (1983).
- Henny, B.W. and T.G. Cleveland: Proc. Beltwide Cotton Production Research Conference 1976.

- Hiraga, K., T. Yokota, N. Murofushi and N. Takahashi: Agric. Biol. Chem. 36, 345-347 (1972).
- Hillman, W.S.: In: The Physiology of Plant Growth and Development London, 557-601 (1969).
- Hollaender, A. and Emmons, C.W.: Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 9, 179-186 (1941).
- Hori, K.: Appl. Entomol. Zool. 10, 130-135 (1975).
- Jones, M.G. and J.A.D. Zeevaart: Planta 149, 274-279 (1980).
- Jones, R.L. and J. MacMillan: In: Advanced Plant Physiology, 1984.
- Kagawa, T., Fukinbara, T. and Y. Sumiki: Agric. Biol. Chem. 27, 598 (1963).
- Kalifah, R.A., Lewis, L.N. and C.W. Coggins: Anal. Biochem. 12, 113 (1965).
- Kamiya, Y. and Graebe, J.E.: Phytochem. 22, 681-689 (1983).
- Kamiya, Y., Takahashi, M. and Takahashi, N.: 12th International Conference on Plant Growth Substances, Heidelberg, 1985.
- Katsumi, M., Ogawa, Y. and Koshimizu, K.: Bot. Mag. (Tokyo) 81, 491-497 (1968).
- King, E.E. and Lane, H.C.: Plant Physiol. 44, 903-906 (1969).
- Klebs, G.: Jena 1903.
- Klebs, G.: Heidelberger Akad. d. Wissenschaften 1911.
- Knapp, E.A., Reuss, A., Risse, O. und Schreiber, H.: Naturwissenschaften 27, 304 (1939).
- Knott, J.E.: Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 31, 152-154 (1934).
- Koshioka, M., Harada, J., Takeno, K., Noma, M., Sassa, T., Ogiyama, K., Taylor, J.S., Rood, S.B., Legge, R.L. and R.P. Pharis: J. Chromatography 256, 101-115 (1983).
- Koshioka, M., Kyotashi, T., Beall, F.D. and R.P. Pharis: Plant Physiol. 73, 398-406 (1983).
- Lang, A.: Naturwissenschaften 43, 284-285 (1956).

- Lang, A.: Proc. Nat. Acad. Sci. 43, 709-717 (1957).
- Lang, A.: In: Differentiation and Development. Encyclopedia of Plant Physiology 15/1, 1380-1536 (1965).
- Lang, A.: In: Plant Growth Substances, 310-322 (1979).
- Lockhart, J.A. and Brodführer-Franzgrote, U.: In: Handbuch der Pflanzenphysiologie 16, 523-554 (1961).
- Murakami, Y.: Bot. Mag. (Tokyo): 81, 33-43 (1968a).
- Murakami, Y.: Bot. Mag. (Tokyo): 81, 100-102 (1968b).
- Peterson, R.L. and Yeung, E.C.: Bot. Gaz. 133, 190-198 (1972).
- Pharis, R.P.: Planta 105, 205-212 (1972).
- Phinney, B.O.: 12th International Conference on Plant Growth Substances, Heidelberg, 1985.
- Picciarelli, P. and Alpi, A.: Plant Cell Physiol. 26 (7), 1233-1239 (1985).
- Pitel, D.W., Vining, L.C. and Arsenault, G.P.: Can. J. Biochem. 49, 185 (1971).
- Powell, R.D.: Proc. Beltwide Cotton Production Research Conferences 1974.
- Ruddat, M., Pharis, R.P., Aoki, H. and Crozier, A.: Plant Physiol. 43, 2049-2053 (1968).
- Sisson, W.B. and Caldwell, M.M.: Plant Physiol. 58, 563-568 (1976).
- Sponsell, V.M. and MacMillan, J.: Planta 135, 129-136 (1977).
- Sponsell, V.M., Hoad, G.V. and Beeley, L.J.: Planta 135, 143-147 (1977).
- Steinmüller, D.: Examensarbeit, Universität Karlsruhe, 1977.
- Suge, H. and Murakami, Y.: The 8th Symposium of the Japanese Society of Plant Physiologists (1967).
- Tevini, M., Iwanzik, W. and Thoma, U.: Planta 153, 388-394 (1981).

- Tingey, W.M. and Pillemer, E.A.: Entomol. Soc. Am. Bull. 23, 277-287 (1977).
- Tournois, J.: Annales des Sciences naturelles. Botanique série 9, t. 19 (1914).
- Van de Pol, P.A.: Meded. Landbouwhoges. Wageningen 72 (9), 1-89 (1972).
- Vince, D.: In: Phytochrome, Acad. Press London, 257-291 (1972).
- Warm, E.: Z. Pflanzenphysiol. 99, 325-330 (1980).
- Wellensiek, S.J.: Proc. Kon. Needl. Acad. Wetensch. 62, 195-203 (1959).
- Williams, E.A. and Morgan, P.W.: Planta 145, 269-272 (1979).
- Zeevaart, J.A.D.: Meded. Landb.Hooges. Wageningen 58, 1-88 (1958).
- Zeevaart, J.A.D.: Science 137, 723-731 (1962).
- Zeevaart, J.A.D.: Plant Physiol. 47, 821-827 (1971).
- Zeevaart, J.A.D.: Ann. Rev. Plant Physiol. 27, 321-384 (1976).
- Zeevaart, J.A.D.: In: Phytohormones and Related Compounds, Biomedical Press, Amsterdam, 291-327 (1978).
- Zeevaart, J.A.D.: In: The Biochemistry and Physiology of Gibberellins, Vol. 2, 333-374; Praeger Scientific, N.Y. 1983.
- Zeevaart, J.A.D.: 12th International Conference on Plant Growth Substances, Heidelberg, 1985.

Mein verehrter Lehrer

Herr Prof. Dr. W. Rau

vermittelte mir über Jahre hinweg Spaß und Freude an der Botanik; dafür und für seine stets engagierte Anleitung zu dieser Arbeit sei ihm an dieser Stelle herzlich gedankt.

Herrn Prof. Dr. P. W. Morgan und Herrn Prof. Dr. R. P. Pharis danke ich für ihre Gastfreundschaft und ihr wissenschaftliches Interesse während meines Aufenthaltes an der Texas A & M University, U.S.A., und an der University of Calgary, Kanada.

Mein Dank gilt ferner dem Arbeitskreis Prof.Dr.H. Scheer für die Bereitstellung einer HPLC-Anlage;

Frau T.Kydd und Frau D.Sensburg für die gewissenhafte wissenschaftliche Mitarbeit;

Herrn P.Debbert, Frl.M.Schwormstede und Frl.A.Hesse für Anzucht und Betreuung der Versuchspflanzen;

Frau A.Oettl und Frau J.Seifert für Reinschrift und Zeichnungen dieses Manuskripts;

Frau H.Hofmann und Frau Dr.U.Mitzka-Schnabel für die stets hilfsbereite Zusammenarbeit.

Lebenslauf:

Name: Daniela Kriechbaum, geb. Erbesdobler

Geburtsort: Wurmannsquick

Geburtstag: 22. Oktober 1957

Familienstand: seit 3.9.1982 verheiratet mit Gangolf W. Kriechbaum

1964-1968 Grundschule Eggenfelden

1968-1977 Gymnasium Eggenfelden

WS 1977/78 Beginn des Studiums der Biologie an der Universität Regensburg

SS 1978 Fortsetzung des Studiums an der Universität München

März 1982 Diplom-Hauptprüfung
Hauptfach: Physiologische Botanik (Prof.Dr.W.Rau)
Nebenfächer: Biochemie (Prof.Dr.G.Hartmann)
Systematische Botanik (Prof. Dr.D.Podlech)

April 1982 bis Diplomarbeit am Botanischen Institut

März 1983 bei Prof.Dr.W.Rau

März 1983 Beginn der Promotion bei Prof.Dr.W.Rau

Mai 1983 bis Forschungsaufenthalt an der Texas A&M University

April 1984 bei Prof.Dr.P.W.Morgan, USA

März 1984 Forschungsaufenthalt an der University of Calgary bei Prof.Dr.R.P.Pharis, Kanada

seit April 1984 Institut für Botanik der Universität München bei Prof.Dr.W.Rau

April 1982 bis Mai 1983 und seit Mai 1984 Praktikumsassistentin am Botanischen Institut.

